illumina®

Guida per l'utente del sistema HiSeq® 2500

SOLO A USO DI RICERCA

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA
N. codice 15035786 Rev. D ITA
Novembre 2014

N. di catalogo SY-401-9001DOC

Personalizzare una breve guida al flusso di lavoro completo con Custom Protocol Selector
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html

CHE INVOCHI INADEMPIMENTO CONTRATTUALE, EXTRACONTRATTUALE O LA RESPONSABILITÀ OGGETTIVA (INCLUSI I CASI DI NEGLIGENZA O ALTRO) DERIVANTI DALL'UTILIZZO DEL PRESENTE SOFTWARE, ANCHE NEL CASO IN CUI SIANO STATI INFORMATI DELLA POSSIBILITÀ DEL VERIFICARSI DI TALI DANNI.

Leggere prima di usare questo prodotto

Questo prodotto, il suo utilizzo e disposizione, sono soggetti ai seguenti termini e condizioni. Se l'acquirente non concorda con questi termini e condizioni, l'acquirente non è autorizzato da Illumina ad utilizzare questo prodotto e l'acquirente non deve utilizzare questo prodotto.

1. **Definizioni**. "**PI per applicazioni specifiche**" indica diritti di proprietà intellettuale controllati o di proprietà di Illumina che riguardano questo prodotto (e il suo utilizzo) solo in relazione ad ambito/i o applicazione/i specifiche. La PI per applicazioni specifiche esclude ogni proprietà intellettuale controllata o di proprietà di Illumina relativa a elementi o caratteristiche di questo prodotto (o del suo utilizzo) che siano comuni a tutte le possibili applicazioni e a tutti i possibili ambiti di utilizzo di questo prodotto (di seguito, la "**PI base**"). La PI per applicazioni specifiche e la PI base sono sottoinsiemi separati e non coincidenti, nemmeno in parte, di tutti i diritti di proprietà intellettuale posseduti o controllati da Illumina. A titolo esemplificativo ma non esaustivo, i diritti di proprietà intellettuale di Illumina per metodi diagnostici specifici, per metodi forensi specifici, o per biomarcatori del DNA, sequenze o combinazioni di biomarcatori o sequenze specifiche sono esempi di PI per applicazioni specifiche. "**Materiali di consumo**" indica i reagenti e i materiali di consumo a marchio Illumina, destinati a essere utilizzati insieme e in combinazione con l'hardware. "**Documentazione**" indica il manuale per l'utente Illumina per questo prodotto, inclusi senza limitazioni, foglietti illustrativi e altra documentazione di accompagnamento per questo prodotto o a cui il prodotto fa riferimento o nella confezione del prodotto in vigore alla data di spedizione del prodotto da Illumina. La documentazione include questo documento. "**Hardware**" indica strumenti, accessori o periferiche Illumina. "**Illumina**" indica Illumina, Inc. o un'affiliata Illumina, come applicabile. "**Prodotto**" indica il prodotto che accompagna questo documento (ad esempio, hardware, materiali di consumo o software). "**Acquirente**" è la persona o l'entità che acquisisce legittimamente e legalmente questo prodotto da Illumina o da un rivenditore autorizzato Illumina. "**Software**" indica il software con marchio Illumina, ad esempio, software operativo per l'hardware o software di analisi dei dati. Il software viene concesso in licenza e non venduto e può essere soggetto a condizioni ulteriori indicate nel contratto di licenza per l'utente finale. "**Specifiche**" indica le specifiche scritte da Illumina per questo prodotto, in vigore alla data di spedizione del prodotto medesimo da parte di Illumina.
2. **Diritti per l'utilizzo a solo scopo di ricerca**. In conformità con i presenti termini e condizioni e se non altrimenti concordato per iscritto da un funzionario Illumina, all'acquirente viene concesso esclusivamente un diritto non esclusivo, non trasferibile, personale, che non può essere fatto oggetto di sublicenza, ai sensi della PI base Illumina, esistente alla data di spedizione di questo prodotto da parte di Illumina, a utilizzare unicamente questo prodotto presso l'impianto dell'acquirente a scopo di ricerca interna (il che comprende i servizi di ricerca forniti a terzi) e unicamente in conformità con la documentazione di questo prodotto, **ma escludendo espressamente qualsiasi uso che** (a) richiederebbe diritti o una licenza da parte di Illumina per PI per applicazioni specifiche, (b) costituisca riutilizzo di un materiale di consumo utilizzato in precedenza, (c) costituisca disassemblaggio, reverse engineering, reverse compiling o reverse assembling di questo prodotto, (d) costituisca separazione, estrazione o isolamento dei componenti di questo prodotto o altra analisi non autorizzata del medesimo, (e) determini l'accesso o individui le modalità di funzionamento di questo prodotto, (f) costituisca utilizzo di reagenti/materiali di consumo non forniti da Illumina con l'hardware del medesimo (non applicabile se le specifiche o la documentazione indicano altrimenti) o (g) costituisce cessione a terzi o sublicenza del software, o di qualsiasi software di terzi. Il software, che venga fornito separatamente, installato o incorporato in un prodotto, viene concesso in licenza all'acquirente e non venduto. A eccezione di quanto espressamente indicato nella presente sezione, nessun diritto o licenza sui diritti di proprietà intellettuale di Illumina viene concessa, espressamente, implicitamente o in base al principio di inopponibilità.

È esclusiva responsabilità dell'acquirente assicurarsi di disporre di tutti i diritti di proprietà intellettuale necessari per gli usi che intende fare di questo prodotto compresi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, diritti da terzi o diritti sulla PI per applicazioni specifiche. Illumina non garantisce in alcun modo che gli usi specifici previsti dall'acquirente non violino i diritti di proprietà intellettuale di terzi o la PI per applicazioni specifiche.

3 **Disposizioni normative**. Questo prodotto non è stato autorizzato o approvato da parte della FDA statunitense o di qualsiasi altro ente normativo nazionale o estero per qualsiasi uso specifico, di ricerca, commerciale, diagnostico o diverso. Questo prodotto è etichettato "Solo per l'utilizzo a scopo di ricerca". L'acquirente deve assicurarsi di disporre delle eventuali autorizzazioni di legge necessarie per gli usi previsti di questo prodotto.

4 **Utilizzi non autorizzati**. L'acquirente accetta quanto segue: (a) di utilizzare ogni materiale di consumo solo una volta e (b) di utilizzare esclusivamente materiali di consumo/reagenti Illumina in combinazione con l'hardware Illumina. Le limitazioni di cui ai punti (a)-(b) non si applicano se la documentazione o le specifiche di questo prodotto indicano altrimenti. L'acquirente concorda di non intraprendere alcuna delle seguenti attività e di non autorizzare terzi a farlo: (i) disassemblare, eseguire il reverse engineering, il reverse compiling o il reverse assembling di questo prodotto, (ii) separare, estrarre o isolare componenti di questo prodotto o sottoporre questo prodotto o suoi componenti a qualsiasi analisi non espressamente autorizzata nella documentazione di questo prodotto, (iii) ottenere l'accesso o tentare di determinare le modalità di funzionamento di questo prodotto o (iv) trasferire a terzi, o concedere in sublicenza, qualsiasi software come sopra definito, o qualsiasi software di terze parti. L'acquirente accetta inoltre che il contenuto e le modalità di funzionamento di questo prodotto sono di proprietà di Illumina e che questo prodotto include o incorpora segreti commerciali di Illumina. Le condizioni e le limitazioni incluse nei presenti termini e condizioni sono condizioni di vendita negoziate e, conseguentemente, controllano la vendita e l'utilizzo di questo prodotti da parte dell'acquirente.

5 **Limitazione di responsabilità. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO ILLUMINA O I SUOI FORNITORI POTRANNO ESSERE RITENUTI RESPONSABILI NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI PER COSTI DI ACQUISIZIONE DI PRODOTTI O SERVIZI SOSTITUTIVI, LUCRO CESSANTE, PERDITA DI DATI O OPPORTUNITÀ COMMERCIALI, O PER DANNI INDIRETTI, SPECIALI, ACCIDENTALI, ESEMPLARI, CONSEGUENTI O PUNITIVI DI QUALSIASI TIPO DERIVANTI O COLLEGATI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, CON LA VENDITA DI QUESTO PRODOTTO, IL SUO UTILIZZO, L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE O CON UNO O PIÙ DEI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, QUALUNQUE NE SIA LA DERIVAZIONE O LA CAUSA E INDIPENDENTEMENTE DAL TITOLO DI RESPONSABILITÀ (CONTRATTUALE, PER ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO).**

6 **LA RESPONSABILITÀ TOTALE E COMPLESSIVA DI ILLUMINA NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI, DERIVANTE O IN CONNESSIONE CON I PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI INCLUSI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, QUESTO PRODOTTO (E IL SUO UTILIZZO) E L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE, A TITOLO DI RESPONSABILITÀ CONTRATTUALE, ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO, IN NESSUN CASO POTRÀ SUPERARE L'IMPORTO CORRISPOSTO A ILLUMINA PER QUESTO PRODOTTO.**

7 **Limitazioni sulle garanzie fornite da Illumina. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE E IN CONFORMITÀ CON LA GARANZIA ESPLICITA DEL PRODOTTO PREVISTA DAI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, ILLUMINA NON FORNISCE (ED ESCLUDE ESPRESSAMENTE) QUALSIASI GARANZIA, ESPLICITA, IMPLICITA O DI LEGGE, IN RELAZIONE A QUESTO PRODOTTO COMPRESE, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, GARANZIE IMPLICITE DI COMMERCIABILITÀ, IDONEITÀ PER UN SCOPO SPECIFICO, NON VIOLAZIONE DI DIRITTI ALTRUI, O DERIVANTI DA ADEMPIMENTO, RAPPORTI COMMERCIALI, UTILIZZO O ATTIVITÀ COMMERCIALE. SENZA LIMITAZIONE DELLA GENERALITÀ DI QUANTO SOPRA, ILLUMINA ESCLUDE QUALSIASI DICHIARAZIONE O GARANZIA DI**

QUALSIVOGLIA TIPO IN RELAZIONE ALL'UTILITÀ DI QUESTO PRODOTTO PER L'IMPIEGO DA PARTE DELL'ACQUIRENTE.

8 **Garanzia sul prodotto**. Tutte le garanzie sono personali per l'acquirente e non possono essere trasferite o cedute a terzi, inclusi affiliati dell'acquirente medesimo. Tutte le garanzie sono relative a impianti specifici e non vengono trasferite in caso di spostamento del prodotto ad altro impianto dell'acquirente, a meno che non sia Illumina a predisporre tale spostamento.

- a **Garanzia sui materiali di consumo**. Illumina garantisce che i materiali di consumo, diversi da quelli personalizzati, saranno conformi alle relative specifiche, fino a (i) 3 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina o (ii) fino alla data di scadenza o al termine del periodo di validità indicato sul materiale di consumo da Illumina, se successivo; ma in ogni caso non oltre 12 mesi dalla data di spedizione. Per quanto riguarda i materiali di consumo personalizzati (vale a dire, confezionati in base a specifiche o indicazioni dell'acquirente o forniti a Illumina da o per conto dell'acquirente), Illumina garantisce esclusivamente che i materiali di consumo personalizzati saranno prodotti e testati in conformità con i processi standard di controllo qualità e produzione di Illumina. Illumina non garantisce che i materiali consumabili personalizzati funzioneranno come previsto dall'acquirente o per gli usi da lui previsti.
- b **Garanzia sull'hardware**. Illumina garantisce che l'hardware, diverso dai componenti aggiornati, sarà conforme alle relative specifiche, per un periodo di 12 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina, a meno che non includa l'installazione a opera di Illumina: in tal caso, il periodo di garanzia decorrerà dalla data di installazione o dal 30° giorno successivo alla data di consegna, se precedente (di seguito la "Garanzia hardware base"). Per "componenti aggiornati" si intendono componenti, modifiche o miglioramenti apportati da Illumina all'hardware precedentemente acquisito dall'acquirente. Illumina garantisce che i componenti aggiornati saranno conformi alle relative specifiche per un periodo di 90 giorni dalla data di installazione I componenti aggiornati non estendono la garanzia dell'hardware, a meno che l'aggiornamento non sia stato eseguito da illumina presso i propri stabilimenti, nel qual caso all'hardware aggiornato spedito all'acquirente si applicherà la garanzia hardware di base.
- c **Esclusioni dalla garanzia**. Le garanzie di cui sopra non si applicano qualora la mancata conformità sia dovuta a: (i) abuso, uso improprio, negligenza, colpa, incidente, conservazione inadeguata o uso contrario alla documentazione o alle specifiche, (ii) movimentazione, installazione, manutenzione o riparazione impropria (a meno che eseguita da personale Illumina), (iii) modifiche non autorizzate, (iv) eventi di forza maggiore o (v) utilizzo con un articolo di terzi non fornito da Illumina (a meno che la documentazione o le specifiche del prodotto indichino espressamente tale articolo come adatto per l'utilizzo con il prodotto).
- d **Procedure per l'applicazione della garanzia**. A scopo di idoneità in relazione alla riparazione o alla sostituzione in garanzia, l'acquirente deve (i) rivolgersi prontamente al Servizio assistenza Illumina per segnalare la non conformità, (ii) fornire la propria collaborazione a Illumina allo scopo di confermare o diagnosticare la non conformità e (iii) restituire questo prodotto a Illumina, anticipando le spese di trasporto, in base alle istruzioni di Illumina o, se concordato tra le parti, consentire al riparatore autorizzato di Illumina di accedere al prodotto, al fine di confermare la non conformità e procedere alla riparazione.
- e **Esclusività della tutela in garanzia**. Illumina provvederà, a sua discrezione, a riparare o a sostituire il prodotto non conforme del quale abbia confermato la copertura in garanzia. Ai materiali di consumo riparati o sostituiti si applica una garanzia di 30 giorni. L'hardware può essere riparato o sostituito con hardware o componenti funzionalmente equivalenti, ricondizionati o nuovi (anche se solo un solo componente dell'hardware sia non conforme). Qualora l'hardware venga sostituito interamente, il periodo di garanzia per la sostituzione è il periodo più breve tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Qualora venga sostituito o riparato unicamente un componente, il periodo di garanzia per il suddetto componente è il periodo che termini più tardi tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Quanto sopra esaurisce i mezzi di tutela a disposizione dell'acquirente e gli obblighi di Illumina ai sensi della garanzia qui prevista.
- f **Articoli di terzi e garanzia**. Illumina non ha alcun obbligo di garanzia in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente ai sensi della presente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il

nome di un terzo. L'eventuale garanzia per gli articoli di terzi è fornita dal produttore originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

9 **Indennizzo**.

a **Indennizzo per violazione di diritti di terzi da parte di Illumina**. In conformità ai presenti termini e condizioni comprese, a titolo esemplificato ma non esaustivo, le esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina (sezione 9(b) di seguito) e le condizioni degli obblighi di indennizzo (sezione 9(d) di seguito), Illumina sarà tenuto (i) a difendere, manlevare e tenere l'acquirente indenne da ogni pretesa o azione di terzi basata sulla presunta violazione di diritti di proprietà intellettuale validi e applicabili di terzi da parte di questo prodotto, quando utilizzato a scopi di ricerca, in conformità con i presenti termini e condizioni, e in conformità con la documentazione e le specifiche relative e (ii) a sostenere i costi di qualsivoglia transazione, sentenza definitiva e spesa (comprese le ragionevoli spese legali) che l'acquirente debba sostenere in relazione a tale pretesa violazione. Qualora questo prodotto o parte di esso divenga o possa diventare secondo l'opinione di Illumina, oggetto di azione per violazione di diritti di terzi, sarà facoltà di Illumina, a sua discrezione: (A) di procurare all'acquirente il diritto di continuare a utilizzare questo prodotto, (B) di modificare o sostituire questo prodotto con un sostituto sostanzialmente equivalente che non configuri violazione o (C) di richiedere la restituzione di questo prodotto e porre fine ai diritti, alla licenza e a ogni altra autorizzazione fornita all'acquirente in relazione a esso, nonché a rimborsare all'acquirente il valore (come indicato nei documenti ufficiali dell'acquirente) del prodotto restituito, tenendo conto dell'ammortamento maturato al momento della restituzione; considerando che nessun rimborso verrà effettuato per i materiali di consumo usati o scaduti. La presente sezione esaurisce la responsabilità di Illumina per qualsiasi violazione di diritti di proprietà intellettuale di terzi.

b **Esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina**. Illumina ha l'obbligo di difendere, indennizzare e tenere indenne l'acquirente da qualsiasi pretesa violazione di diritti di terzi da parte di Illumina, nella misura in cui essa derivi da: (i) l'utilizzo di questo prodotto in qualsiasi modo o per qualsiasi scopo non compreso nell'ambito dell'utilizzo per scopi di ricerca, (ii) l'utilizzo di questo prodotto in modo non conforme alle sue caratteristiche tecniche, alla documentazione, ai diritti espressamente concessi all'acquirente nell'ambito della presente o in violazione, da parte dell'acquirente, dei presenti termini e condizioni, (iii) l'utilizzo di questo prodotto in combinazione con altri prodotti, materiali o servizi non forniti da Illumina, (iv) l'utilizzo di questo prodotto per eseguire saggi o altri processi non forniti da Illumina o (v) la conformità di Illumina con specifiche o istruzioni per questo prodotto fornite da o per conto dell'acquirente (ciascuno dei punti da (i) a (v) viene di seguito definito come una "Pretesa oggetto di esclusione").

c **Indennizzo da parte dell'acquirente**. L'acquirente dovrà difendere, manlevare e tenere indenne Illumina, i suoi affiliati, i loro collaboratori non affiliati e partner di sviluppo che abbiano contribuito allo sviluppo di questo prodotto, nonché i rispettivi funzionari, dirigenti, rappresentanti e dipendenti, da qualsiasi pretesa, responsabilità, danno, multa, penale, azione legale e perdita di ogni e qualsivoglia tipo comprese, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, azioni per danni a persone o decesso, e violazioni di diritti di proprietà intellettuale di terzi, derivanti, relativi o che siano originati da (i) violazione da parte dell'acquirente di uno dei presenti termini e condizioni, (ii) utilizzo di questo prodotto da parte dell'acquirente al di fuori dell'ambito di utilizzo per scopi di ricerca, (iii) qualsiasi utilizzo di questo prodotto non conforme alle specifiche o alla documentazione relativa o (iv) qualsiasi pretesa oggetto di esclusione.

d **Condizioni degli obblighi di indennizzo**. Gli obblighi di indennizzo delle parti sono condizionali al fatto che la parte che richiede l'indennizzo (i) informi tempestivamente la controparte, in forma scritta, della pretesa o dell'azione relativa, (ii) conferisca alla controparte controllo e autorità esclusivi in relazione alla difesa e alla transazione di tale pretesa o azione, (iii) non ammetta la violazione di qualsivoglia diritto di proprietà intellettuale altrui senza il preventivo consenso scritto della controparte, (iv) non concluda alcuna transazione o compromesso relativo a qualsivoglia pretesa o azione senza il preventivo consenso scritto della controparte e infine (v) fornisca ragionevole assistenza alla controparte nella difesa della pretesa o azione; a condizione che la parte indennizzata venga rimborsata dalla controparte per le ragionevoli spese effettivamente sostenute per fornire tale assistenza.

e **Articoli di terzi e indennizzo**. Illumina non ha alcun obbligo di indennizzo in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il nome di un terzo. Gli eventuali diritti di indennizzo dell'acquirente in relazione ad articoli di terzi saranno quelli previsti ai sensi degli obblighi di indennizzo del produttore o del licenziante originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

Cronologia revisioni

N. codice	Rev.	Data	Descrizione della modifica
15035786_ITA	D	Novembre 2014	Aggiornato il flusso di lavoro Rapid Run (Corsa rapida) per la compatibilità con la chimica HiSeq Rapid v2. Sostituito il lavaggio di manutenzione con NaOH con il lavaggio di manutenzione con Tween 20 e ProClin 300 comprese le informazioni sulla preparazione, conservazione e smaltimento della soluzione di lavaggio di manutenzione. Aggiornate le descrizioni del lavaggio di manutenzione e del lavaggio con acqua per specificare che è richiesto un lavaggio con acqua dopo una corsa. Aggiunte le descrizioni per flusso di lavoro, file di input e di output, gestione degli errori e punteggi qualitativi nel capitolo Software Real-Time Analysis. Aggiornato il n. di catalogo VWR per le salviettine imbevute di alcol a 95041-714. Aggiornato l'URL per le schede di sicurezza (SDS) all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.
15035786_ITA	C	Aprile 2014	Aggiornate le descrizioni software a HiSeq Control Software v2.2, che includono la modalità ad output elevato HiSeq v4, la rimozione dell'opzione di controllo della corsia, il raggruppamento predefinito dei punteggi qualitativi e l'opzione per usare diversi schemi di indicizzazione in ciascuna corsia. Aggiunto il flusso di lavoro HiSeq v4 da usare con la chimica HiSeq v4. Aggiunto il calcolo per il volume SBS totale per il priming.
15035786_ITA	B	Novembre 2013	Rimosse le istruzioni per la preparazione dei reagenti. Per le istruzioni per la preparazione dei reagenti incluse le informazioni sui diversi primer di sequenziamento, consultare la documentazione allegata al kit. Sostituiti i reagenti seguenti: • RMR per RMX

N. codice	Rev.	Data	Descrizione della modifica
15035786_ITA	A	Ottobre 2012	Versione iniziale.

Sommario

Descrizione generale

Capitolo 1

Introduzione

Il sistema HiSeq® unisce una progettazione innovativa con la tecnologia SBS consolidata per definire nuovi standard di output, semplicità ed efficacia dei costi.

HiSeq 2500 comprende le caratteristiche seguenti:

- **Imaging a doppia superficie**: HiSeq 2500 utilizza un sistema a epifluorescenza a quattro videocamere con tecnologia di scansione all'avanguardia per consentire l'imaging a doppia superficie.
- **Doppia cella a flusso**: HiSeq 2500 è un sistema a doppia cella a flusso, che consente di sequenziare simultaneamente una singola cella a flusso o due celle a flusso con lunghezze di letture diverse.
- **Generazione dei cluster integrata sullo strumento**: HiSeq 2500 fornisce l'opzione della modalità Rapid Run (Corsa rapida) che comprende la generazione dei cluster integrata sullo strumento.
- **Ampio vano refrigerato per i reagenti**: lo scomparto reagenti è un ampio vano refrigerato che contiene reagenti sufficienti per l'intera corsa di sequenziamento.
- **Fluidica integrata per corse paired-end**: la fluidica integrata paired-end fornisce i reagenti dallo scomparto reagenti alla cella a flusso per la risintesi Lettura 2 e per il sequenziamento indicizzato.
- **Opzioni dei controlli dell'interfaccia**: l'interfaccia software dello strumento fornisce varie opzioni per l'impostazione della corsa e per il funzionamento dello strumento utilizzando il monitor touch screen o la tastiera integrata.
- **Identificazione delle basi in tempo reale**: il software dello strumento estrae le intensità dalle immagini ed esegue l'identificazione delle basi qualitativamente valutate sul computer dello strumento, il che permette di monitorare le metriche di qualità durante la corsa e di risparmiare tempo prezioso durante la successiva analisi dei dati.
  L'analisi a valle dei dati di sequenziamento può essere eseguita con il software di analisi Illumina o software di terze parti su IlluminaCompute, su BaseSpace Illumina o una infrastruttura personalizzata.
- **Connettività BaseSpace**: HiSeq 2500 dispone di un'opzione per inviare i dati relativi al sequenziamento e alla salute dello strumento tramite la soluzione genomica sul cloud di BaseSpace in tempo reale per semplificare il controllo della qualità e l'analisi dello strumento.

Componenti di HiSeq 2500

Il sistema HiSeq 2500 include lo strumento, un monitor, un computer di controllo dello strumento e accessori quali una tastiera, un mouse e uno scanner per codici a barre. Lo strumento include quattro scomparti principali: modulo ottica, scomparto della cella a flusso, scomparto della fluidica e scomparto reagenti. Lo stato operativo dello strumento è indicato da una barra di stato illuminata.

Figura 1 Componenti esterni

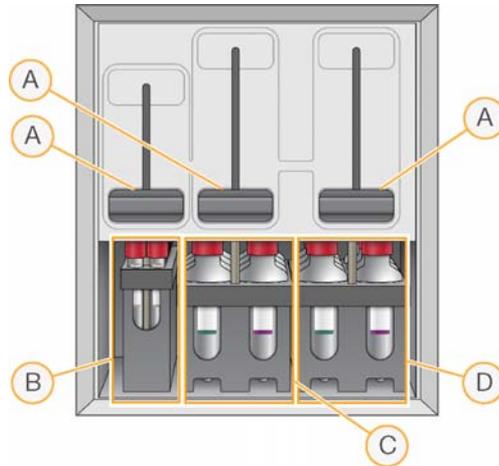
- A **Modulo ottica**: contiene i componenti ottici che consentono l'imaging a doppia superficie della cella a flusso, per l'acquisizione contemporanea di A, C, G e T mediante epifluorescenza. Il fascio laser di eccitazione passa attraverso l'obiettivo e la fluorescenza viene raccolta attraverso lo stesso obiettivo.
- B **Scomparto della cella a flusso e stazione di caricamento della libreria**: contiene il piano portacelle a depressione, che tiene in posizione la cella a flusso durante le corse di sequenziamento. Usando la modalità Rapid Run (Corsa rapida), la stazione di caricamento trasferisce le librerie alla cella a flusso per la generazione dei cluster integrata sullo strumento.
- C **Scomparto della fluidica**: contiene le pompe della fluidica che erogano i reagenti alla cella a flusso e poi al contenitore per gli scarti.
- D **Barra di stato**: utilizza tre colori per indicare lo stato dello strumento. Il blu indica che lo strumento è in esecuzione, l'arancione indica che lo strumento necessita attenzione e il verde indica che lo strumento è pronto a iniziare la corsa successiva.

E **Scomparto reagenti**: contiene i rack reagenti con i reagenti per le corse di sequenziamento e la soluzione di lavaggio per i lavaggi dello strumento.

Scomparto reagenti

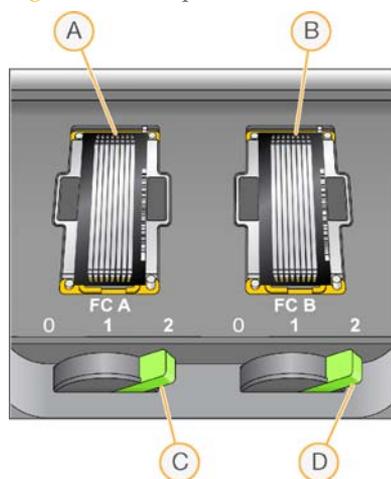
Lo scomparto reagenti è un ampio vano refrigerato per i reagenti che contiene tre rack reagenti: due per i reagenti SBS e uno per i reagenti per la generazione di cluster, di indicizzazione e PE. Le maniglie del pettine di aspirazione abbassano i pescanti nei flaconi di reagente.

- **Rack reagenti SBS**: contengono flaconi conici da 250 ml. Il rack reagenti per la cella a flusso A si trova nella posizione centrale e il rack reagenti per la cella a flusso B si trova nella posizione all'estrema destra. Ciascun rack reagenti dispone di posizioni numerate che corrispondono ai collegamenti a una valvola selettore dei reagenti interna.
- **Rack reagenti per la generazione di cluster, PE e di indicizzazione**: il rack reagenti è posizionato alla sinistra dei rack A e B. Presenta due righe di posizioni numerate che contengono provette coniche da 15 ml contenenti i reagenti per la generazione di cluster e PE e i reagenti di indicizzazione. La riga a sinistra è per la cella a flusso A e la riga a destra è per la cella a flusso B.
- **Vano refrigerato per i reagenti**: il vano refrigerato per i reagenti alloggia i rack reagenti e mantiene una temperatura interna compresa tra 2 °C e 8 °C.

Figura 2 Scomparto reagenti

A Maniglie del pettine di aspirazione
B Rack reagenti per la generazione di cluster, PE, di indicizzazione
C Rack reagenti SBS per la cella a flusso A
D Rack reagenti SBS per la cella a flusso B

Scomparto della cella a flusso

Lo scomparto della cella a flusso contiene il piano portacelle, le stazioni termiche, il sistema del vuoto e le connessioni della fluidica a ciascuna cella a flusso.

Figura 3 Piano portacelle con due celle a flusso

- **A** Cella a flusso A
- **B** Cella a flusso B
- **C** Leva della cella a flusso A
- **D** Leva della cella a flusso B

La cella a flusso sulla sinistra è la cella a flusso A e la cella a flusso sulla destra è la cella a flusso B.

Ciascuna cella a flusso è posizionata sul piano portacelle, che si sposta dentro e fuori il modulo ottica come indicato dal software di controllo. Il piano portacelle deve trovarsi nella posizione più anteriore per aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso o per rimuovere una cella a flusso.

La cella a flusso è posizionata nel vano portacella con le porte di ingresso e di uscita rivolte verso il basso ed è tenuta in posizione da una pompa a vuoto sotto ciascuna cella a flusso. La leva della cella a flusso illuminata di fronte a ciascun vano portacella controlla la pompa a vuoto. La leva della cella a flusso diventa verde quando la tenuta del vuoto è corretta.

Avvio di HiSeq 2500

1. Avviare il computer di controllo dello strumento.
2. Accedere al sistema operativo usando il nome utente e la password predefiniti:
   - Nome utente: sbsuser
   - Password: sbs123

   Attendere che il caricamento giunga a termine. Se i valori predefiniti non funzionano, consultare l'amministratore della struttura per individuare il nome utente e la password specifici per la struttura.
3. Portare l'interruttore principale in posizione ON. Se si sta di fronte allo strumento, l'interruttore si trova sul lato sinistro.
4. Attendere almeno 1 minuto per la configurazione corretta dei dispositivi dello strumento e per l'inizializzazione dell'unità dello strumento denominata "DoNotEject" (Non espellere). Alla conclusione dell'inizializzazione dell'unità si apre una finestra. Chiudere la finestra. Se la finestra non si apre, usare MyComputer per controllare l'unità DoNotEject (Non espellere).

NOTA
Non espellere mai l'unità di tipo flash denominata DoNotEject (Non espellere) posta all'interno del telaio dello strumento ed evitare di modificare i file su tale unità. Questa unità contiene file della configurazione hardware e si inizializza ogni volta che lo strumento viene acceso.

5. Per garantire uno spazio su disco adeguato, archiviare in rete i dati che si trovano sul computer dello strumento e provengono dalle analisi precedenti.
6. Aprire HiSeq Control Software (HCS) utilizzando l'icona del collegamento sul desktop del computer. Per l'inizializzazione del software di controllo, sono necessari alcuni minuti. Una volta inizializzato il software, si apre la schermata Mode Select (Selezione modalità) e nella parte inferiore destra della schermata appare l'icona di inizializzazione Initialized.

Pratiche migliori per gestire lo strumento e il computer di controllo

- Non accendere il computer quando lo strumento è in funzione. Accendere sempre il computer prima di accendere lo strumento.
- Non spegnere lo strumento quando il software di controllo dello strumento è in esecuzione.
- Dopo aver spento lo strumento, attendere un minuto prima di accenderlo di nuovo.
- Prima di accendere il computer, collegare i cavi USB per lo strumento, il monitor e la tastiera alla parte posteriore del computer.
- Collegare lo scanner per codici a barre e il mouse alle porte USB sulla parte anteriore del computer.

Software HiSeq 2500

Sul computer dello strumento sono installate tre applicazioni software:

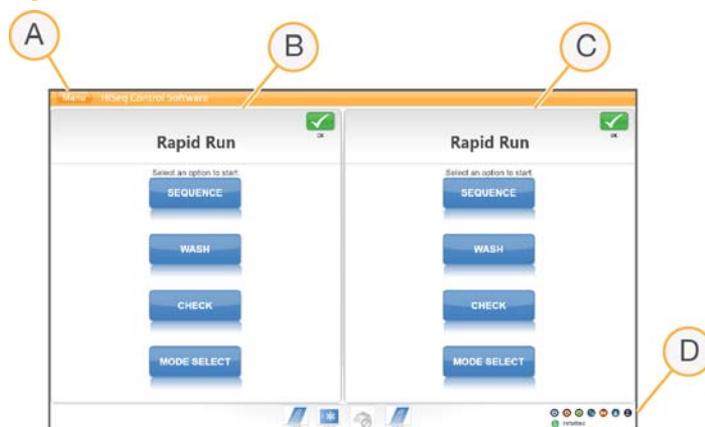
- **HiSeq 2500 Control Software**: l'interfaccia HiSeq Control Software (HCS) guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione di una corsa di sequenziamento. Durante la corsa, il software di controllo agisce sull'hardware dello strumento, verifica la fluidica, imposta le temperature e fornisce un riepilogo visivo delle statistiche qualitative.
- **Software Real-Time Analysis**: integrato con il software di controllo, Real-Time Analysis (RTA) esegue l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo. Per maggiori informazioni, vedere *Software Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 129.
- **Software Sequencing Analysis Viewer**: Sequencing Analysis Viewer (SAV) fornisce statistiche dettagliate sulla qualità.

Interfaccia di HiSeq 2500 Control Software

La schermata Mode Select (Selezione modalità) fornisce le opzioni per le modalità della corsa. Le modalità includono TruSeq v3, HiSeq v4 e Rapid Run (Corsa rapida). Selezionare una modalità della corsa per procedere alla schermata Welcome (Benvenuto). Poiché solo le corse della stessa modalità possono essere elaborate contemporaneamente, la modalità selezionata viene applicata alla cella a flusso A e alla cella a flusso B.

La schermata Welcome (Benvenuto) è divisa in due riquadri, uno per ciascuna cella a flusso. Utilizzando l'interfaccia software, l'utente può impostare una corsa per la cella a flusso A e per la cella a flusso B in parallelo. Utilizzando l'interfaccia software, è inoltre possibile impostare le corse indipendentemente.

La schermata Welcome (Benvenuto) fornisce i comandi per avviare una corsa di sequenziamento, il lavaggio dello strumento, l'esecuzione di una verifica del sistema e il passaggio di modalità. La modalità attuale viene visualizzata nella parte superiore della schermata. Una volta completata una corsa, il software chiede di lavare lo strumento. Dopo il lavaggio, il software torna alla schermata Welcome (Benvenuto).

Figura 4 Schermata Welcome (Benvenuto)

A Pulsante del menu della schermata Welcome (Benvenuto)
B Riquadro dell'interfaccia per la cella a flusso A
C Riquadro dell'interfaccia per la cella a flusso B
D Indicatori di attività

Comandi della schermata Welcome (Benvenuto)

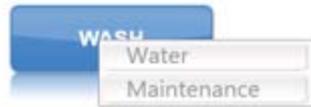
I comandi della schermata Welcome (Benvenuto) includono Sequence (Sequenziamento), Wash (Lavaggio), Check (Verifica) e Mode Select (Selezione modalità).

- **Sequence** (Sequenziamento): selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per avviare la procedura di impostazione di una nuova corsa di sequenziamento o per riprendere una corsa esistente.

Figura 5 Opzioni del comando Sequence (Sequenziamento)

- **New Run** (Nuova corsa): il software guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione dei parametri della corsa, caricamento e priming dei reagenti, caricamento della cella a flusso, esecuzione delle verifiche della fluidica e avvio della corsa.

- **Resume Run** (Ripresa corsa): il software guida l'utente lungo la procedura di scelta della cartella della corsa esistente e di impostazione dei parametri per la ripresa della corsa.
   - **Rehyb Run** (Corsa reibridazione): il software guida l'utente nella procedura di reibridazione primer integrata sullo strumento. Questa funzione è disponibile solo in HiSeq v4 e Rapida Run (Corsa rapida).
- **Wash** (Lavaggio): selezionare **Wash** (Lavaggio) per avviare un lavaggio dello strumento o un lavaggio di manutenzione.

Figura 6 Opzioni del comando Wash (Lavaggio)

   - **Water Wash** (Lavaggio con acqua): il lavaggio con acqua fa scorrere acqua nel sistema. Questo lavaggio è richiesto dopo una corsa di sequenziamento o dopo che uno strumento è rimasto nello stato inattivo per uno o più giorni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.
   - **Maintenance Wash** (Lavaggio di manutenzione): il lavaggio di manutenzione fa scorrere nel sistema Tween 20 e ProClin 300. Questo lavaggio è richiesto prima del passaggio di modalità od ogni 10 giorni ed è un'opzione raccomandata dopo una corsa ad output elevato. Vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 118.
- **Check** (Verifica): selezionare **Check** (Verifica) per aprire la schermata di verifica della fluidica e per confermare il flusso corretto durante l'installazione dello strumento o la risoluzione dei problemi della fluidica.
- **Mode Select** (Selezione modalità): selezionare **Mode Select** (Selezione modalità) per passare da una modalità all'altra. Le modalità della corsa includono TruSeq v3, HiSeq v4 e Rapid Run (Corsa rapida).

Indicatori di attività e sensori

La schermata Welcome (Benvenuto) contiene nell'angolo inferiore destro una serie di icone che indicano l'attività dello strumento e lo stato di componenti specifici in base ai sensori dello strumento.

Figura 7 Indicatori di attività

Da sinistra a destra, gli indicatori di attività rappresentano i motori X, Y e Z, la funzionalità dell'elettronica, la videocamera, il sistema di fluidica e le funzioni di elaborazione.

Figura 8 Indicatori dei sensori

Da sinistra a destra, gli indicatori dei sensori rappresentano la temperatura della cella a flusso A, la temperatura del vano refrigerato per i reagenti, lo stato del cloud computing BaseSpace e la temperatura della cella a flusso B.

Icone di stato

Un'icona di stato è posta nell'angolo superiore destro di ciascuna schermata e segnala cambiamenti nelle condizioni operative durante la procedura di impostazione della corsa e durante la corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Nessun cambiamento. Le condizioni del sistema sono normali.
	Informazione	Solo a fini informativi. Non si richiede alcun intervento.
	Attenzione	Informazione che richiama l'attenzione dell'utente.
	Avvertenza	Le avvertenze non provocano l'arresto della corsa, ma possono subordinarne il proseguimento a un intervento dell'utente.
	Errore	In genere gli errori provocano l'arresto della corsa, che potrà continuare solo dopo un intervento dell'utente.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona associata lampeggia per avvertire l'utente. Per risolvere questo avviso, selezionare l'icona per aprire la finestra di dialogo dello stato contenente una descrizione generale della condizione segnalata. Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Menu della schermata Welcome (Benvenuto)

Il pulsante del menu della schermata Welcome (Benvenuto), posto nell'angolo superiore sinistro della schermata Welcome, fornisce le seguenti opzioni:

- **View** (Visualizza): fornisce opzioni per visualizzare l'interfaccia a schermo intero o in una finestra, o per minimizzare l'interfaccia.
- **Tools** (Strumenti): fornisce l'accesso alla finestra Options (Opzioni) e al file Show Log:
  - **Options** (Opzioni): dalla finestra Options (Opzioni), definire le impostazioni predefinite per la corsa. Vedere *Menu della finestra Options (Opzioni)* a pagina 13.
  - **Show Log File** (File "Show Log"): elenca qualsiasi errore verificatosi nel software di controllo. Il file è vuoto a meno che non si sia verificato un errore. Utilizzare questo file di registro per la risoluzione dei problemi.
- **Scanner** (Scanner): attiva il comando per inizializzare il software manualmente.
- **About** (Info su): fornisce informazioni sull'hardware dello strumento, sulle versioni del software e su come mettersi in contatto con l'Assistenza tecnica.
- **Exit** (Esci): chiude l'interfaccia del software di controllo.

Menu della finestra Options (Opzioni)

Il menu della finestra Options (Opzioni) fornisce le impostazioni per definire il modello del nome della corsa, le posizioni delle cartelle predefinite, un server LIMS, un nome utente e password e se inviare le informazioni sulla salute dello strumento a Illumina.

Figura 9 Menu della finestra Options (Opzioni)

- **Run ID Template** (Modello nome cartella corsa): la convenzione utilizzata per assegnare il nome e generare i nomi delle cartelle della corsa.
- **Default Output Folder** (Cartella di output predefinita): la posizione di output predefinita per le corse sulla cella a flusso A. Questa posizione può essere cambiata corsa per corsa.
- **Default Output Folder2** (Cartella di output predefinita 2): la posizione di output predefinita per le corse sulla cella a flusso B. Questa posizione può essere cambiata corsa per corsa.
- **Default Temp Folder1** (Cartella temporanea predefinita 1): la posizione in cui sono scritti i file temporanei durante una corsa.
- **Run Setup Folder** (Cartella impostazione corsa): la posizione dei moduli campioni LIMS.
- **LIMS Server** (Server LIMS): il nome del server per l'interazione con i file LIMS supportati da Illumina.
- **LIMS User Name** (Nome utente LIMS): il nome utente usato per l'autenticazione dei file LIMS Illumina
- **LIMS Password** (Password LIMS): la password usata per l'autenticazione dei file LIMS Illumina
- **Send instrument health information to Illumina to aid technical support Illumina** (Invia informazioni sulla salute del sistema per aiutare il supporto tecnico Illumina): permette allo strumento di inviare informazioni a BaseSpace per ogni corsa. Tutte le informazioni rimangono confidenziali. Illumina raccomanda di attivare questa funzione.

Spazio disponibile su disco

Il computer dello strumento HiSeq dispone di una capacità di memorizzazione di più di 2,7 TB per ciascuna cella a flusso. I dati provenienti dalla cella a flusso A sono memorizzati sull'unità D: e i dati provenienti dalla cella a flusso B sono memorizzati sull'unità E:.

Al completamento di ciascun ciclo di imaging per ciascuna corsia, il software verifica lo spazio disponibile sul disco locale D: ed E:. Durante la corsa, il software non controlla la posizione della rete. Se lo spazio sul disco scende al di sotto di una soglia di sicurezza, il software mette in pausa la corsa e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.

Se lo spazio su disco diventa troppo scarso, per continuare la corsa rendere disponibile dello spazio. Quando diventa disponibile sufficiente spazio su disco, la corsa riprende automaticamente.

Panoramica sul foglio campioni

Il foglio campioni è un file generato dall'utente in formato *.csv (comma separated values, valori separati da virgola) che contiene informazioni relative alla corsa di sequenziamento. Quando la corsa viene avviata, il software copia il foglio campioni nella cartella della corsa dove viene usato per l'analisi.

I fogli campioni sono opzionali a meno che non si usi BaseSpace per eseguire l'analisi dei dati, eseguire una corsa di indicizzazione o pianificare il monitoraggio delle prestazioni per il de-multiplexing utilizzando il software Sequencing Analysis Viewer. Usare Illumina Experiment Manager (IEM) per creare un foglio campioni ***prima*** di avviare la corsa.

Materiali di consumo per il sequenziamento

Il sequenziamento su HiSeq 2500 richiede reagenti e altri materiali di consumo forniti nei kit Illumina. I kit richiesti dipendono dal tipo di corsa che si desidera eseguire.

- Per le corse ad output elevato HiSeq v4, vedere *Materiali di consumo per il sequenziamento HiSeq v4* a pagina 22.
- Per le corse ad output elevato TruSeq v3, vedere *Materiali di consumo per il sequenziamento TruSeq v3* a pagina 50.
- Per le corse Rapid Run (Corsa rapida), vedere *Materiali di consumo per il sequenziamento Rapid Run (Corsa rapida)* a pagina 84.

Materiali di consumo forniti dall'utente

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Tween 20, liquido viscoso, 100 ml	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Lavaggio di manutenzione dello strumento.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 48912-U	Lavaggio di manutenzione dello strumento.
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure di etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714 Fornitore generico	Pulizia della cella a flusso e del piano portacelle.
Provette per centrifuga, 250 ml	Corning, n. di catalogo 430776	Lavaggio di manutenzione e lavaggio con acqua dello strumento.
Provette coniche, 15 ml	Corning, n. di catalogo 430052	Raccolta e misura del volume degli scarti. Lavaggio di manutenzione e lavaggio con acqua dello strumento.
Provette coniche, 50 ml, con base d'appoggio (facoltative)	Corning, n. di catalogo 430921	Conservazione delle celle a flusso.
Damigiana, da almeno 6 litri	Fornitore generico	Soluzione di lavaggio di manutenzione.
Guanti monouso, privi di polvere lubrificante	Fornitore generico	Uso generale.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026	Pulizia del vano portacella.
Carta pulente per lenti, 10x15 cm ca.	VWR, n. di catalogo 52846-001	Pulizia della cella a flusso.
Punte per pipette, da 200 µl	Fornitore generico	Separazione dei volumi dei kit di reagenti.
Punte per pipette, da 1000 µl	Fornitore generico	Separazione dei volumi dei kit di reagenti.
Pinzette di plastica con punta quadrata	McMaster-Carr, n. di catalogo 7003A22	Rimozione delle guarnizioni della cella a flusso.
Acqua, da laboratorio,18 M Ohm	Millipore	Rack reagenti SBS, posizione 2. Lavaggio dello strumento.

Provette per microcentrifuga per la modalità Rapid Run (Corsa rapida)

Materiale di consumo	Fornitore
Provetta per microcentrifuga da 1,5 ml	VWR, n. di catalogo 20170-038, n. di catalogo 20170-650 o n. di catalogo 89000-028 Axygen, n. di catalogo MCT-150-C
Provetta per microcentrifuga da 1,7 ml	VWR, n. di catalogo 20170-575 Axygen, n. di catalogo MCT-175-C Sorenson BioScience, n. di catalogo 16070

Risorse addizionali

È possibile scaricare la documentazione seguente dal sito Web Illumina.

Risorsa	Descrizione
Guida alla preparazione della sede di installazione per HiSeq 2500, 1500 e 2000 (n. codice 15006407)	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
Guida sulla sicurezza e conformità dello strumento HiSeq (n. codice 15012614)	Fornisce informazioni sulla etichettatura dello strumento, le certificazioni di conformità e gli aspetti relativi alla sicurezza.
Guida di preparazione dei reagenti HiSeq Cluster Kit v4 (n. codice 15050104)	Fornisce una descrizione dei contenuti dei kit cluster e le istruzioni per preparare i materiali di consumo prima di una corsa di sequenziamento.
Guida di preparazione dei reagenti HiSeq Rapid Cluster Kit v2 (n. codice 15059131)	Fornisce una descrizione dei contenuti dei kit cluster e le istruzioni per preparare i materiali di consumo prima di una corsa di sequenziamento rapida.
Guida di preparazione dei reagenti HiSeq SBS Kit v4 (n. codice 15050108)	Fornisce una descrizione dei contenuti dei kit SBS e le istruzioni per preparare i materiali di consumo prima di una corsa di sequenziamento.
Guida di preparazione dei reagenti di HiSeq Rapid SBS Kit v2 (n. codice 15058772)	Fornisce una descrizione dei contenuti dei kit SBS e le istruzioni per preparare i materiali di consumo prima di una corsa di sequenziamento rapida.
Denaturazione e diluizione delle librerie per HiSeq e GAIIx (n. codice 15050107)	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX. Questa fase si applica alla maggior parte dei tipi di librerie.

Consultare la pagina di supoprto di HiSeq 2500 sul sito Web Illumina sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, ai training online e alle domande frequenti (FAQ).

Esecuzione di una corsa HiSeq v4

Capitolo 2

Introduzione

Per eseguire una corsa HiSeq v4 su HiSeq 2500, preparare tutti i reagenti per la corsa e attenersi ai suggerimenti del software per impostare la corsa. La procedura per l'impostazione della corsa include l'inserimento dei parametri della corsa, il caricamento e il priming dei reagenti, il caricamento della cella a flusso e una verifica della fluidica.

Per informazioni relative alla durata della corsa e altre specifiche delle prestazioni, visitare la pagina delle specifiche di HiSeq 2500 sul sito Web Illumina.

Materiali di consumo per il sequenziamento HiSeq v4

Nome kit HiSeq v4	Descrizione
HiSeq SBS Kit v4	Contiene i reagenti SBS usati su HiSeq 2500.
HiSeq PE Cluster Kit v4 o HiSeq SR Cluster Kit v4	Contiene i reagenti per la generazione di cluster usati su cBot e i reagenti di indicizzazione usati su HiSeq 2500. La versione PE del kit per la generazione di cluster include i reagenti paired-end usati su HiSeq 2500. Ciascun kit per la generazione di cluster include un kit di accessori contenente le guarnizioni sostitutive della cella a flusso e i tappi a imbuto per i flaconi di reagente SBS.

Procedura per la preparazione dei reagenti

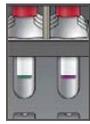
Prima di impostare la corsa, preparare i reagenti SBS, i reagenti di indicizzazione e i reagenti PE, se applicabile.

- Per la preparazione dei reagenti SBS, consultare la *Guida di riferimento per HiSeq SBS Kit v4 (n. codice 15050108)*.
- Per la preparazione dei reagenti di indicizzazione e PE, consultare la *Guida di riferimento per HiSeq Cluster Kit v4 (n. codice 15050104)*.

Preparare tutti i reagenti prima di impostare la corsa. Quando suggerito dal software di controllo, caricare tutti i reagenti. Quando si usa la chimica HiSeq v4, non è necessario tornare allo strumento durante la corsa per caricare i reagenti.

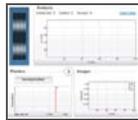
Flusso di lavoro per il sequenziamento HiSeq v4

Preparare i reagenti per la corsa. Dopo la preparazione, pesare i reagenti. Per informazioni sulla preparazione dei reagenti, vedere *Procedura per la preparazione dei reagenti* a pagina 22.

Utilizzando il software di controllo, immettere i parametri della corsa.

Quando suggerito, caricare tutti i reagenti per la corsa:

- Caricare i reagenti SBS per la Lettura 1 e per la Lettura 2.
- Per le corse indicizzate, caricare i reagenti di indicizzazione.
- Per le corse paired-end, caricare i reagenti paired-end.

Con una cella a flusso usata sullo strumento, confermare il flusso corretto.
Eseguire il priming dei reagenti SBS e misurare lo scarto del priming.

Caricare la cella a flusso con cluster per il sequenziamento. Confermare il flusso corretto.

Avviare la corsa di sequenziamento.
[Opzionale] Dopo il ciclo 1, ispezionare il report sulla prima base e poi proseguire la Lettura 1.
La corsa prosegue come indicato nei parametri della corsa.

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti.
Eseguire un lavaggio dello strumento.

Tipi di corse per la chimica HiSeq v4

La tabella seguente mostra i tipi di corse di sequenziamento e il numero di cicli possibili per ciascuna lettura usando la chimica HiSeq v4. Utilizzare queste informazioni come riferimento quando si imposta la corsa.

Tipo di corsa	Cicli Lettura 1	Cicli di lettura Indice 1 (i7)	Cicli di lettura Indice 2 (i5)	Cicli Lettura 2	Cicli totali
Unidirezionale, non indicizzata	≤ 126	--	--	--	≤ 126
Unidirezionale, singola indicizzazione	≤ 126	6 o 7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 133 [1] ≤ 134 [2]
Unidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 126	8	8	--	≤ 142
Paired-end, non indicizzata	≤ 126	--	--	≤ 126	≤ 252
Paired-end, singola indicizzazione	≤ 126	7 [1] 8 [2]	--	≤ 126	≤ 259 [1] ≤ 260 [2]
Paired-end, doppia indicizzazione	≤ 126	8	7 + 8 [3]	≤ 126	≤ 275

[1] Numero di cicli per librerie con singola indicizzazione
[2] Numero di cicli per librerie con doppia indicizzazione
[3] La Lettura Indice 2 di una corsa paired-end con doppia indicizzazione include sette cicli addizionali di sola chimica

Inserimento dei parametri della corsa

Dalla schermata Welcome (Benvenuto) del software, selezionare **Sequence | New Run** (Sequenzia | Nuova corsa).

L'interfaccia del software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione della corsa. Il processo di impostazione della corsa è organizzato in tre schede: Run Configuration, Pre-Run Setup e Initiate Run (Configurazione corsa, Impostazioni pre-corsa e Avvio corsa).

- Le schermate di configurazione della corsa contengono elenchi a tendina, caselle di controllo o campi di testo per i parametri della corsa. Usare lo scanner portatile per codici a barre per scansionare l'ID della cella a flusso o del kit di reagenti, oppure inserire l'ID utilizzando la tastiera di tipo touch screen. L'icona della tastiera si trova a destra dei campi per il testo.
- Selezionare **Next** (Avanti) per passare alla schermata successiva o selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata precedente.
- In qualunque momento durante la procedura di impostazione della corsa, è possibile selezionare **Cancel** (Annulla) per uscire dall'impostazione della corsa e tornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Schermata Integration (Integrazione)

La schermata Integration (Integrazione) fornisce l'opzione di collegare la corsa a BaseSpace.

Per collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1. Selezionare **BaseSpace**.
2. Selezionare da una delle seguenti opzioni BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Archiviazione e analisi): invia i dati della corsa a BaseSpace per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati. Con questa opzione, è richiesto un foglio campioni.
   - **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia solo i file InterOp a BaseSpace, che permettono di monitorare la corsa in remoto.
3. Accedere a BaseSpace utilizzando l'e-mail e la password dell'account MyIllumina.
4. Selezionare **Next** (Avanti).

Per proseguire senza collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1 Selezionare **None** (Nessuno).

2 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Storage (Archiviazione)

1 Selezionare la casella di controllo **Save to an output folder** (Salva in una cartella di output) e selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare a una posizione della rete preferita. Se per l'archiviazione e l'analisi la corsa è collegata a BaseSpace, questo campo è facoltativo.

2 Selezionare **Zip BCL files** (Comprimi file BCL) per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Se la corsa è collegata a BaseSpace, l'opzione **Zip BCL files** (Comprimere file BCL) è selezionata per impostazione predefinita.

NOTA
L'impostazione **Bin Q-Scores** (Raggruppa punteggi qualitativi) è attivata per impostazione predefinita per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Questa impostazione raggruppa i punteggi qualitativi su un intervallo di valori più ampio senza incidere su accuratezza o prestazioni.

3 Selezionare dalle opzioni Save Auxiliary Files (Salva file ausiliari) seguenti:
- **Save All Thumbnails** (Salva tutte le miniatura): salva tutte le immagini in miniatura. Un'immagine in miniatura è una campionatura di immagini da diverse tile in ciascuna colonna di tile o striscia, combinata in un'immagine in miniatura.
- **Save Tile Thumbnails** (Salva miniature delle tile): salva le immagini in miniatura delle tile. Le immagini in miniatura delle tile rappresentano una singola tile piuttosto che un campionamento di tile in una striscia.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso)

La schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso) registra le informazioni relative alla cella a flusso utilizzata per la corsa. Sono richiesti tutti i campi.

1 Eseguire la scansione del codice a barre della cella a flusso o inserire l'ID (numero del codice a barre) della cella a flusso da sottoporre a sequenziamento. L'ID della cella a flusso è usata per determinare il tipo di cella a flusso e la compatibilità dei reagenti.

2 Confermare che il tipo di cella a flusso sia **HiSeq Flow Cell v4** (Cella a flusso HiSeq v4). Il tipo di cella a flusso viene selezionato automaticamente in base all'ID della cella a flusso.

3 Inserire un nome per l'esperimento. Il nome dell'esperimento appare su ciascuna schermata per permettere di identificare la corsa in esecuzione.

4 Inserire un nome utente.

5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Advanced (Avanzato)

1 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Confirm First Base** (Conferma incorporazione prima base).
Un report sulla prima base viene generato automaticamente per ciascuna corsa. La selezione di questa opzione apre il report sulla prima base prima di procedere con la corsa.

2 [Opzionale] Dalle caselle di controllo **Align to PhiX** (Allineamento con PhiX), deselezionare la casella di controllo per le corsie che non contengono PhiX.
Come impostazione predefinita, tutte le corsie sono selezionate per l'allineamento tramite il software Real-Time Analysis (RTA).
In alternativa, selezionare le corsie sull'immagine della cella a flusso per aggiungere o rimuovere le corsie per l'allineamento PhiX.

NOTA
Con HCS v2.2 e RTA v1.18 non è richiesta una corsia di controllo dedicata. Quindi, l'opzione per assegnare una corsia di controllo non è disponibile con questa configurazione software.

3 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Recipe (Ricetta)

1 Selezionare dalle seguenti opzioni per Index Type (Tipo indice):
- **No Index** (Nessun indice): esegue una corsa non indicizzata unidirezionale oppure paired-end.
- **Single Index** (Singolo indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con una lettura di indicizzazione.

- **Dual Index** (Doppio indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con due letture di indicizzazione.
- **Custom** (Personalizzata): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con un numero di cicli personalizzato per le letture indici.

2 Se è stata specificata l'opzione Dual Index (Doppio indice) o Custom (Personalizzato), selezionare un Flow Cell Format (Formato cella a flusso), **Single Read** (Singola lettura) o **Paired End** (Paired-end).

3 Immettere il numero di cicli per Lettura 1 e Lettura 2, se applicabile.

NOTA
Il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, per eseguire 125 cicli per la Lettura 1, immettere 126.

Per l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzato), immettere il numero di cicli per le letture indici. Le lunghezze delle letture non devono essere identiche.

4 Confermare le impostazioni predefinite seguenti per la chimica. Questi campi sono popolati automaticamente in base all'opzione di tipo indice selezionata.
   a **SBS**: **HiSeq SBS v4 Kit**
   b **Index (Indice)**: **HiSeq v4 Single Index** o **HiSeq v4 Dual Index**
   c **PE turnaround (Inversione PE)**: **HiSeq PE Cluster Kit v4**

5 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) per usare una ricetta personalizzata. Altrimenti, permettere al software di creare la ricetta in base ai parametri della corsa inseriti.

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

I fogli campioni sono opzionali a meno che non si usi BaseSpace per eseguire l'analisi dei dati o eseguire una corsa con indicizzazione.

1 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione del foglio campioni.

2 Selezionare **Next** (Avanti).

NOTA
HiSeq Control Software v2.2 permette uno schema di indicizzazione diverso per ciascuna corsia.

Schermata Reagents (Reagenti)

La schermata Reagents (Reagenti) registra informazioni sui kit di reagenti utilizzati per la corsa. L'ID del kit di reagenti (numero del codice a barre che inizia con **RGT**) viene utilizzato per determinare il tipo di kit di reagenti e la compatibilità con la modalità della corsa.

1 Eseguire la scansione o immettere l'ID del kit di reagenti SBS.

2 Per le corse paired-end, scansionare o inserire l'ID del kit di reagenti per il kit cluster paired-end.

3 Selezionare il kit di reagenti SBS per la corsa:
- Selezionare **250 Cycles** (250 cicli) per un kit da 250 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 275.
- Selezionare **50 Cycles** (50 cicli) per un kit da 50 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 74.
- Selezionare **Custom** (Personalizza) per un kit parziale o kit multipli da 50 cicli. Nel campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti), inserire il numero di cicli SBS per i quali si prevede che i reagenti dureranno.

NOTA
Per i kit parziali, il software esegue un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi.

4 Selezionare **Prime SBS Reagents** (Priming reagenti SBS) per eseguire il priming dei reagenti prima di avviare una corsa. Eseguire sempre il priming dei reagenti prima di caricare una cella a flusso nuova.

5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Review (Revisione)

1 Rivedere i parametri della corsa dalla schermata Review (Revisione).

2 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere o selezionare **Back** (Indietro) per modificare i parametri.

Caricamento e priming dei reagenti

Dopo aver immesso i parametri della corsa, caricare i reagenti SBS, di indicizzazione e paired-end per la corsa, e quindi eseguire il priming dei reagenti nel sistema di fluidica. Il software guida l'utente in questo processo tramite una serie di schermate sulla scheda Pre-Run Setup (Impostazioni pre-corsa).

Materiali di consumo forniti da Illumina

- 8 tappi a imbuto

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Flacone da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Provette coniche da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Acqua da laboratorio

NOTA
Per preparare il risciacquo post-corsa al termine di una corsa di sequenziamento, caricare 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio nella posizione 2.

Il risciacquo post-corsa ***non*** sostituisce il lavaggio post-corsa dello strumento.

Caricamento dei reagenti SBS

1. Capovolgere ciascun flacone diverse volte per assicurarsi che i reagenti siano miscelati completamente.
2. Rimuovere il tappo da ciascun flacone di reagente e sostituirlo con un tappo a imbuto.

ATTENZIONE
Dopo aver manipolato il flacone di CRM, smaltire i guanti e sostituirli con un nuovo paio.

3. Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

NOTA
La pesatura dei reagenti prima e dopo la corsa di sequenziamento conferma l'erogazione appropriata dei reagenti.

4. Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
5. Sollevare i pescanti per il rack reagenti per il sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:

a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
   b Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

6. Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti.
7. Posizionare ogni flacone di reagente sul rack nelle posizioni numerate associate. Assicurarsi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

Tabella 1 Posizioni dei reagenti

Posizione	Reagente	Descrizione
1	IRM	Incorporation Reagent Master Mix
2	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
3	USM	Universal Scan Mix
4	Tampone SBS 1 (SB1)	High Salt Buffer
5	Tampone SBS 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
6	Tampone SBS 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
7	CRM	Cleavage Reagent Mix
8	Tampone SBS 3 (SB3)	Cleavage Buffer

8. Aggiungere 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio al flacone nella posizione 2.
9. Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.
10. Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente per il sequenziamento come segue:
    a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé e abbassare la maniglia.
    b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
    c Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.
11. Selezionare la casella di controllo **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 - 25 ml - caricato).

Caricamento dei reagenti di indicizzazione

1. Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

2 Assicurarsi che il rack dei reagenti PE non sia in uso sulla cella a flusso adiacente. I passaggi che usano il rack dei reagenti PE includono risintesi Lettura 2, preparazione Lettura Indice 1 (i7) e preparazione Lettura Indice 2 (i5).

3 Sollevare i pescanti per il rack dei reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
   b Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

4 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.

5 Rimuovere i tappi da ciascuna provetta di reagente e posizionare la provetta sul rack nella posizione numerata associata o facendo corrispondere il colore dell'etichetta.

Tabella 2 Celle a flusso unidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
15	FDR	Fast Denaturation Reagent (contiene formammide)
16	HP9 *	Index Sequencing Primer i5
17	HP12	Index Sequencing Primer i7

* HP9 non è richiesto solo per le corse a doppia indicizzazione. Se HP9 non viene usato, caricare una provetta conica da 15 ml con 10 ml di acqua da laboratorio nella posizione n. 16.

Tabella 3 Celle a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
10	FRM *	Fast Resynthesis Mix
15	FDR	Fast Denaturation Reagent (contiene formammide)
17	HP12	Index Sequencing Primer i7

* Caricare FRM nella posizione 10 per corse a doppia indicizzazione su una cella a flusso paired-end. FRM è richiesto nella posizione 10 per tutte le corse paired-end indipendentemente dalle opzioni di indicizzazione.

6 Se si sta eseguendo una corsa unidirezionale, passare alla procedura seguente per riportare il rack nello scomparto reagenti. In caso contrario, procedere con il caricamento dei reagenti paired-end.

7 Collocare provette coniche da 15 ml riempite con 10 ml di acqua da laboratorio nelle posizioni non usate sul rack dei reagenti PE.

8 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

9 Se si sta eseguendo una corsa unidirezionale, abbassare i pescanti nelle provette di reagenti PE nel modo seguente:
   a Tirare la maniglia verso di sé e quindi abbassare la maniglia.
   b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

10 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento dei reagenti PE

1 Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

2 Sollevare i pescanti per il rack dei reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
   b Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

3 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.

4 Rimuovere i tappi da ciascuna provetta di reagente e posizionare la provetta sul rack nella posizione numerata associata o facendo corrispondere il colore dell'etichetta.

Tabella 4 Celle a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
10	FRM *	Fast Resynthesis Mix
11	FLM2	Fast Linearization Mix 2
13	AMS	Fast Amplification Mix
14	FPM	Fast Amplification Premix
15	FDR *	Fast Denaturation Reagent (contiene formammide)
16	HP11	Primer sequenziamento Lettura 2

* Se sono stati caricati reagenti di indicizzazione per una corsa unidirezionale, FDR è già caricato nella posizione 10. Se sono stati caricati reagenti di indicizzazione per una corsa a doppia indicizzazione, FRM e FDR sono già caricati nelle posizioni 10 e 15, rispettivamente.

5 Collocare provette coniche da 15 ml riempite con 10 ml di acqua da laboratorio nelle posizioni non usate sul rack dei reagenti PE.

6 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

7 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente PE come segue:
   a Tirare la maniglia verso di sé e quindi abbassare la maniglia.
   b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

8 Selezionare **Next** (Avanti).

Priming dei reagenti

La procedura per il priming dei reagenti include la pulizia del vano portacella, il caricamento di una cella a flusso per il priming, la conferma del flusso corretto e l'avvio del priming.

Pulizia del vano portacella

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

ATTENZIONE
Non porre liquidi sullo sportello dello scomparto della cella a flusso o sul piano portacelle quando lo sportello è aperto. Fuoriuscite di liquido in quest'area possono danneggiare lo strumento.

2 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia in posizione OFF.

Figura 10 Leva della cella a flusso in posizione 0

3 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

4 Se è presente una cella a flusso usata in una corsa precedente, rimuoverla e metterla da parte in una provetta di tampone di conservazione o acqua da laboratorio per evitare che si asciughi. La si può utilizzare per verificare il corretto flusso prima di caricare la cella a flusso con cluster.

5 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

6 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

Figura 11 Posizioni dei fori della pompa a vuoto

Caricamento di una cella a flusso per il priming

Dalla schermata Load Priming Flow Cell (Caricamento cella a flusso per il priming) caricare una cella a flusso ***usata***, per eseguire la fase di priming. Dopo il caricamento di una cella a flusso usata, confermare che la pompa a vuoto sia posizionata correttamente.

NOTA
Illumina consiglia di usare la cella a flusso proveniente da una corsa precedente per il priming dei reagenti su una corsa successiva o per un lavaggio dello strumento post-corsa.

1 Sciacquare con acqua da laboratorio la cella a flusso usata. Asciugare la cella a flusso con una salvietta per la pulizia delle lenti o con un panno che non lascia residui.

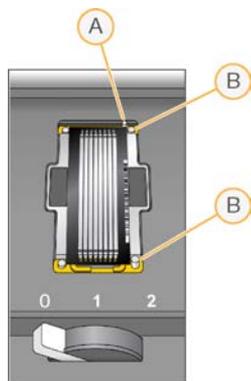
2 Pulire la cella a flusso usando panni imbevuti di alcol e salviette per la pulizia delle lenti.

NOTA
Durante questa fase, non rimuovere o sostituire le guarnizioni della cella a flusso.

3 Collocare la cella a flusso usata sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.

4 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

Figura 12 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

5 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 149.

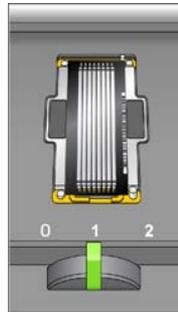
Figura 13 Leva della cella a flusso in posizione 1

6 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2 (tutto a destra). Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 14 Leva della cella a flusso in posizione 2

7 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata caricamento cella a flusso per il priming e poi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 2 (acqua da laboratorio) dall'elenco a tendina.

ATTENZIONE
Usare acqua per confermare il flusso corretto solo su una cella a flusso usata. Non usare mai acqua per confermare il flusso corretto su una cella a flusso con cluster.

2 Confermare i valori predefiniti seguenti:
   - Volume (Volume): **125**
   - Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
   - Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 125 µl di acqua nella cella a flusso. Se il problema persiste, rimuovere la cella a flusso, ripetere le fasi di pulizia e ricaricare la cella a flusso.

Posizionamento dei tubi e avvio del priming

1 Rimuovere gli otto tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore per gli scarti.
Non includere gli otto tubi per la cella a flusso opposta, o i tubi per la pompa di scarico condensa.

Figura 15 Posizione dei tubi

A Tubi di scarico della cella a flusso per le posizioni 1-8 dei reagenti
B Tubo della pompa di scarico condensa (non rimuovere)

2 Collocare i tubi di scarico in una provetta da 15 ml vuota, un provetta per gli scarti per una provetta da 15 ml. Gli scarti del priming vengono raccolti e misurati dopo la fase di priming.

3 Selezionare **Start Prime** (Avvia priming). Si apre la schermata di priming e si avvia la fase di priming. Monitorare l'avanzamento della fase di priming dall'apposita schermata.

4 Al completamento della fase di priming, misurare gli scarti raccolti e confermare che il volume in ciascuna provetta sia 1,75 ml per un totale di **14 ml**. Il totale viene calcolato come segue:
   - 250 µl per ciascuna posizione SBS, fatta eccezione per la posizione 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
   - 1,75 ml per ciascuna corsia (1,75 x 8 = 14 ml)

5 Registrare i risultati sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

6 Riposizionare i tubi di scarico nel contenitore per gli scarti prima di procedere.

7 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento di una cella a flusso

Le fasi per il caricamento di una cella a flusso con cluster include la rimozione della cella a flusso per il priming, la pulizia del vano portacella, il caricamento della cella a flusso e la conferma del flusso corretto.

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Panno per la pulizia delle lenti
- Salviette con alcol o etanolo al 70%
- Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle
- Un paio di pinze

Rimozione della cella a flusso usata

1 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per sbloccare i collettori.

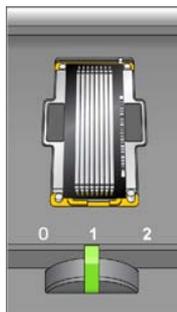
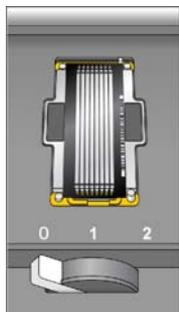
Figura 16 Leva della cella a flusso in posizione 1

2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 0 per sbloccare la tenuta del vuoto e rilasciare la cella a flusso.

Figura 17 Leva della cella a flusso in posizione 0

3 Sollevare la cella a flusso usata dal vano portacella.

Pulizia del vano portacella

1 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

2 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

Figura 18 Ispezione dei fori della pompa a vuoto

3 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

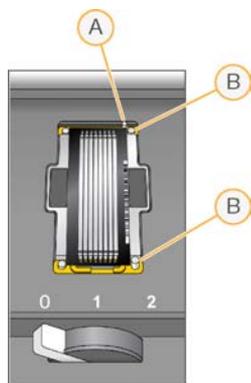
Pulizia della cella a flusso

1. Rimuovere la cella a flusso dal contenitore della cella a flusso usando un paio di pinze.
2. Sciacquare la cella a flusso con acqua da laboratorio e asciugarla con un panno pulente per lenti.
3. Piegare una salvietta imbevuta di alcol fino approssimativamente alle dimensioni della cella a flusso.
4. Tenere i bordi della cella a flusso con cluster con due dita. Assicurarsi che le porte di ingresso e di uscita siano rivolte ***verso l'alto***.
5. Pulire ogni lato della cella a flusso con un unico movimento. Ripetere, ripiegando il panno a ogni passaggio, fino a quando la cella a flusso non è pulita.
6. Asciugare la cella a flusso con un panno pulente per lenti.
7. Proteggere la cella a flusso dalla polvere fino a quando la si carica sullo strumento.

Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

NOTA
Non sostituire le guarnizioni dei collettori. Sostituire le guarnizioni dei collettori dopo il completamento della corsa di sequenziamento e prima del lavaggio di manutenzione.

1. Collocare la cella a flusso sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso punti verso lo strumento.
2. Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 19 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 149.

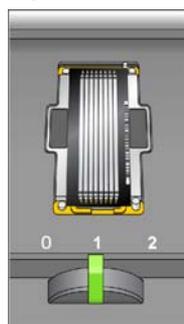
Figura 20 Leva della cella a flusso in posizione 1

4 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2. Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 21 Leva della cella a flusso in posizione 2

5 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata Load Sequencing Flow Cell (Caricamento della cella a flusso di sequenziamento).

Conferma del flusso corretto

La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 5 dall'elenco a tendina.

2 Inserire i valori predefiniti seguenti:
- Volume (Volume): **250**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie o di perdite vicino ai collettori.
Se sono presenti bolle, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori e ripetere il processo usando la soluzione 6 per evitare di esaurire la posizione 5. Ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl verso la cella a flusso.

5 Selezionare **Next** (Avanti). Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia verde e chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

6 Confermare che le caselle di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate e poi selezionare **Next** (Avanti).

7 Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la corsa di sequenziamento.

Monitoraggio della corsa

Monitorare le metriche della corsa, la fluidica e l'imaging sulla schermata di panoramica della corsa.

Figura 22 Schermata di panoramica della corsa

A **Barra di avanzamento**: utilizzare la barra di avanzamento per monitorare quanti cicli sono stati completati.

B **Grafico della fluidica**: allargare la sezione della fluidica per monitorare le fasi della chimica.

C **Configurazione della corsa**: per rivedere i parametri per la corsa attuale.

D **Grafico dell'analisi**: utilizzare il grafico dell'analisi per monitorare i punteggi qualitativi secondo il ciclo.

E **Grafico delle immagini**: utilizzare il grafico delle immagini per monitorare le intensità secondo il ciclo.

Report sulla prima base

Se durante la procedura di impostazione è stata selezionata l'opzione **Confirm First Base** (Conferma prima base), viene visualizzata automaticamente la finestra di dialogo di conferma relativa all'incorporazione della prima base al termine dell'imaging del primo ciclo. In questa fase la corsa si mette in pausa.

1 Dalla finestra di dialogo di conferma, rivedere First Base Report (Report sulla prima base).

2 Se i risultati sono soddisfacenti, selezionare **Continue** (Continua).

Procedure post-corsa

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti ed eseguire un lavaggio dello strumento. Per maggiori informazioni vedere *Procedure post-corsa* a pagina 115.

Esecuzione di una corsa TruSeq v3

Capitolo 3

Introduzione

Per eseguire una corsa TruSeq v3 su HiSeq 2500, preparare i reagenti SBS per Lettura 1 e i reagenti di indicizzazione prima di impostare la corsa. Attenersi ai suggerimenti del software per impostare la corsa, che includono l'immissione dei parametri della corsa, il caricamento e il priming dei reagenti, il caricamento della cella a flusso e l'esecuzione della verifica della fluidica.

Preparare e caricare i reagenti paired-end e i reagenti SBS per Lettura 2 dopo il completamento di Lettura 1 e qualsiasi lettura indice.

Per informazioni relative alla durata della corsa e altre specifiche delle prestazioni, visitare la pagina delle specifiche di HiSeq 2500 sul sito Web Illumina.

Materiali di consumo per il sequenziamento TruSeq v3

Nome kit TruSeq v3	Descrizione
TruSeq SBS Kit v3 (200 Cycles) o TruSeq SBS Kit v3 (50 Cycles)	Contiene i reagenti SBS usati su HiSeq 2500.
TruSeq PE Cluster Kit v3 o TruSeq SR Cluster Kit v3	Contiene i reagenti per la generazione di cluster usati su cBot e i reagenti di indicizzazione usati su HiSeq 2500. La versione PE del kit per la generazione di cluster include i reagenti paired-end usati su HiSeq 2500. Ciascun kit per la generazione di cluster include un kit di accessori contenente le guarnizioni sostitutive della cella a flusso e i tappi a imbuto per i flaconi di reagente SBS.

Procedura per la preparazione dei reagenti

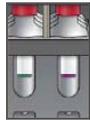
- Per la preparazione dei reagenti SBS, consultare la guida appropriata:
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq SBS Kit v3 (200 cicli) (n. codice 15023333)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq SBS Kit v3 (50 cicli) (n. codice 15023334)*
- Per la preparazione dei reagenti di indicizzazione e PE, consultare la guida appropriata:
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq PE Cluster Kit v3 (n. codice 15023336)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq SR Cluster Kit v3 (n. codice 15023335)*

  Queste guide includono le istruzioni per la preparazione dei primer di sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Flusso di lavoro per il sequenziamento TruSeq v3

Preparare i reagenti SBS per la Lettura 1 e i reagenti di indicizzazione. Dopo la preparazione, pesare i reagenti.

Per informazioni sulla preparazione dei reagenti, vedere *Procedura per la preparazione dei reagenti* a pagina 51.

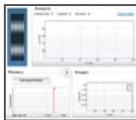
Utilizzando il software di controllo, immettere i parametri della corsa.

Quando suggerito, caricare tutti i reagenti SBS per la Lettura 1.

Caricare i reagenti SBS per la Lettura 2, fatta eccezione per ICB.

Caricare i reagenti di indicizzazione.

Con una cella a flusso usata sullo strumento, confermare il flusso corretto.

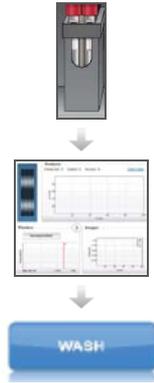
Eseguire il priming dei reagenti SBS e misurare lo scarto del priming.

Caricare la cella a flusso con cluster per il sequenziamento. Confermare il flusso corretto.

Avviare la corsa di sequenziamento.

[Opzionale] Dopo il ciclo 1, ispezionare il report sulla prima base e poi proseguire la Lettura 1.

La corsa prosegue come indicato nei parametri della corsa.

Preparare i reagenti paired-end e ICB fresco per la Lettura 2. Dopo la preparazione, pesare i reagenti.

Per informazioni sulla preparazione dei reagenti, vedere *Procedura per la preparazione dei reagenti* a pagina 51.

Caricare i reagenti paired-end e ICB fresco per la Lettura 2.

Continuare la corsa. Il software esegue automaticamente il priming dei reagenti paired-end, la risintesi Lettura 2 e la Lettura 2.

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti.
Eseguire un lavaggio dello strumento.

Tipi di corsa per la chimica TruSeq v3

La tabella seguente mostra i tipi di corse di sequenziamento e il numero di cicli possibili per ciascuna lettura usando la chimica TruSeq v3. Utilizzare queste informazioni come riferimento quando si imposta la corsa.

Tipo di corsa	Cicli Lettura 1	Cicli di lettura Indice 1 (i7)	Cicli di lettura Indice 2 (i5)	Cicli Lettura 2	Cicli totali
Unidirezionale, non indicizzata	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Unidirezionale, singola indicizzazione	≤ 101	6 o 7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 108 [1] ≤ 109 [2]
Unidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 101	8	8	--	≤ 117
Paired-end, non indicizzata	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
Paired-end, singola indicizzazione	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	≤ 101	≤ 209 [1] ≤ 210 [2]
Paired-end, doppia indicizzazione	≤ 101	8	7 + 8 [3]	≤ 101	≤ 225

[1] Numero di cicli per librerie con singola indicizzazione
[2] Numero di cicli per librerie con doppia indicizzazione
[3] La Lettura Indice 2 di una corsa paired-end con doppia indicizzazione include sette cicli addizionali di sola chimica

Inserimento dei parametri della corsa

Dalla schermata Welcome (Benvenuto) del software, selezionare **Sequence | New Run** (Sequenzia | Nuova corsa).

L'interfaccia del software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione della corsa. Il processo di impostazione della corsa è organizzato in tre schede: Run Configuration, Pre-Run Setup e Initiate Run (Configurazione corsa, Impostazioni pre-corsa e Avvio corsa).

- Le schermate di configurazione della corsa contengono elenchi a tendina, caselle di controllo o campi di testo per i parametri della corsa. Usare lo scanner portatile per codici a barre per scansionare l'ID della cella a flusso o del kit di reagenti, oppure inserire l'ID utilizzando la tastiera di tipo touch screen. L'icona della tastiera si trova a destra dei campi per il testo.
- Selezionare **Next** (Avanti) per passare alla schermata successiva o selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata precedente.
- In qualunque momento durante la procedura di impostazione della corsa, è possibile selezionare **Cancel** (Annulla) per uscire dall'impostazione della corsa e tornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Schermata Integration (Integrazione)

La schermata Integration (Integrazione) fornisce l'opzione di collegare la corsa a BaseSpace.

Per collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1. Selezionare **BaseSpace**.
2. Selezionare da una delle seguenti opzioni BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Archiviazione e analisi): invia i dati della corsa a BaseSpace per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati. Con questa opzione, è richiesto un foglio campioni.
   - **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia solo i file InterOp a BaseSpace, che permettono di monitorare la corsa in remoto.
3. Accedere a BaseSpace utilizzando l'e-mail e la password dell'account MyIllumina.
4. Selezionare **Next** (Avanti).

Per proseguire senza collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1 Selezionare **None** (Nessuno).
2 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Storage (Archiviazione)

1 Selezionare la casella di controllo **Save to an output folder** (Salva in una cartella di output) e selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare a una posizione della rete preferita. Se per l'archiviazione e l'analisi la corsa è collegata a BaseSpace, questo campo è facoltativo.
2 Selezionare **Zip BCL files** (Comprimi file BCL) per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Se la corsa è collegata a BaseSpace, l'opzione **Zip BCL files** (Comprimere file BCL) è selezionata per impostazione predefinita.

NOTA
L'impostazione **Bin Q-Scores** (Raggruppa punteggi qualitativi) è attivata per impostazione predefinita per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Questa impostazione raggruppa i punteggi qualitativi su un intervallo di valori più ampio senza incidere su accuratezza o prestazioni.

3 Selezionare dalle opzioni Save Auxiliary Files (Salva file ausiliari) seguenti:
   - **Save All Thumbnails** (Salva tutte le miniatura): salva tutte le immagini in miniatura. Un'immagine in miniatura è una campionatura di immagini da diverse tile in ciascuna colonna di tile o striscia, combinata in un'immagine in miniatura.
   - **Save Tile Thumbnails** (Salva miniature delle tile): salva le immagini in miniatura delle tile. Le immagini in miniatura delle tile rappresentano una singola tile piuttosto che un campionamento di tile in una striscia.
4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso)

La schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso) registra le informazioni sulla cella a flusso utilizzata per la corsa.

1 Eseguire la scansione del codice a barre della cella a flusso o immettere l'ID (numero del codice a barre) della cella a flusso da sottoporre a sequenziamento. L'ID della cella a flusso è utilizzata per determinare il tipo di cella a flusso e la compatibilità dei reagenti.

2 Confermare che il tipo di cella a flusso sia **HiSeq Flow Cell v3** (Cella a flusso HiSeq v3), che viene selezionato automaticamente in base all'ID della cella.

3 Inserire un nome per l'esperimento. Il nome dell'esperimento appare su ciascuna schermata per permettere di identificare la corsa in esecuzione.

4 Inserire un nome utente.

5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Advanced (Avanzato)

1 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Confirm First Base** (Conferma incorporazione prima base).
Un report sulla prima base viene generato automaticamente per ciascuna corsa. La selezione di questa opzione apre il report sulla prima base prima di procedere con la corsa.

2 [Opzionale] Dalle caselle di controllo **Align to PhiX** (Allineamento con PhiX), deselezionare la casella di controllo per le corsie che non contengono PhiX.
Come impostazione predefinita, tutte le corsie sono selezionate per l'allineamento tramite il software Real-Time Analysis (RTA).
In alternativa, selezionare le corsie sull'immagine della cella a flusso per aggiungere o rimuovere le corsie per l'allineamento PhiX.

NOTA
Con HCS v2.2 e RTA v1.18 non è richiesta una corsia di controllo dedicata. Quindi, l'opzione per assegnare una corsia di controllo non è disponibile con questa configurazione software.

3 [Opzionale] Selezionare **Keep Intensity Files** (Mantieni i file intensità) per la ripetizione dell'analisi successivamente o l'elaborazione personalizzata.
Come impostazione predefinita, questa opzione non è selezionata. Il salvataggio dei file delle intensità non è necessario per le analisi integrate sullo strumento. L'attivazione di questa opzione aumenta significativamente la dimensione della cartella di output dei dati.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Recipe (Ricetta)

In base alle informazioni inserite nella schermata Recipe (Ricetta), viene generata automaticamente una ricetta.

1 Selezionare una delle seguenti opzioni per Index Type (Tipo indice):
   - **No Index** (Nessun indice): esegue una corsa non indicizzata unidirezionale oppure paired-end.
   - **Single Index** (Singolo indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con una lettura di indicizzazione.
   - **Dual Index** (Doppio indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con due letture di indicizzazione.
   - **Custom** (Personalizzata): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con un numero di cicli personalizzato per le letture indici.

2 Se è stata specificata l'opzione Dual Index (Doppio indice) o Custom (Personalizzato), selezionare un Flow Cell Format (Formato cella a flusso), **Single Read** (Singola lettura) o **Paired End** (Paired-end).

3 Immettere il numero di cicli per Lettura 1 e Lettura 2, se applicabile.

NOTA
Il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, per eseguire 125 cicli per la Lettura 1, immettere 126.

Per l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzato), immettere il numero di cicli per le letture indici. Le lunghezze delle letture non devono essere identiche.

4 Confermare le impostazioni predefinite seguenti per la chimica. Questi campi sono popolati automaticamente in base all'opzione di tipo indice selezionata.
   a **SBS**: **TruSeq SBS Kit v3**
   b **Index (Indice)**: **TruSeq Multiplex Sequencing Primer Box** o **TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box**
   c **PE turnaround (Inversione PE)**: **TruSeq PE Cluster Kit v3**

5 [Opzionale] Selezionare **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) per usare una ricetta personalizzata. Altrimenti, permettere al software di creare la ricetta in base ai parametri della corsa inseriti.

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

I fogli campioni sono opzionali a meno che non si usi BaseSpace per eseguire l'analisi dei dati o eseguire una corsa con indicizzazione.

1 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione del foglio campioni.

2 Selezionare **Next** (Avanti).

NOTA
HiSeq Control Software v2.2 permette uno schema di indicizzazione diverso per ciascuna corsia.

Schermata Reagents (Reagenti)

La schermata Reagents (Reagenti) registra informazioni sui kit di reagenti utilizzati per la corsa. L'ID del kit di reagenti (numero del codice a barre che inizia con **RGT**) viene utilizzato per determinare il tipo di kit di reagenti e la compatibilità con la modalità della corsa.

1 Eseguire la scansione o immettere l'ID del kit di reagenti SBS.

2 Per le corse paired-end, scansionare o inserire l'ID del kit di reagenti per il kit cluster paired-end.

3 Selezionare il kit di reagenti SBS per la corsa:
- Selezionare **200 Cycles** (200 cicli) per un kit da 200 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 209.
- Selezionare **50 Cycles** (50 cicli) per un kit da 50 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 59.
- Selezionare **Custom** (Personalizza) per un kit parziale o kit multipli da 50 cicli. Nel campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti), inserire il numero di cicli SBS per i quali si prevede che i reagenti dureranno.

NOTA
Per i kit parziali, il software esegue un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi.

4 Selezionare **Prime SBS Reagents** (Priming reagenti SBS) per eseguire il priming dei reagenti prima di avviare una corsa. Eseguire sempre il priming dei reagenti prima di caricare una cella a flusso nuova.

5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Review (Revisione)

1 Rivedere i parametri della corsa dalla schermata Review (Revisione).

2 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere o selezionare **Back** (Indietro) per modificare i parametri.

Caricamento e priming dei reagenti

Dopo aver immesso i parametri della corsa, caricare i reagenti SBS e di indicizzazione per la corsa, e quindi eseguire il priming dei reagenti nel sistema di fluidica. Il software guida l'utente in questo processo tramite una serie di schermate sulla scheda Pre-Run Setup (Impostazioni pre-corsa).

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Otto tappi a imbuto

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Flacone da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Provette coniche da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Acqua da laboratorio

NOTA
Per preparare il risciacquo post-corsa al termine di una corsa di sequenziamento, caricare 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio nella posizione 2.

Il risciacquo post-corsa ***non*** sostituisce il lavaggio post-corsa dello strumento.

Caricamento dei reagenti SBS

1 Rimuovere il tappo da ciascun flacone di reagente e sostituirlo con un tappo a imbuto.

ATTENZIONE
Dopo aver manipolato il flacone di CMR, smaltire i guanti e sostituirli con un nuovo paio.

2 Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

NOTA
La pesatura dei reagenti prima e dopo la corsa di sequenziamento conferma l'erogazione appropriata dei reagenti.

3 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.

4 Sollevare i pescanti per il rack reagenti per il sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:

a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.

b Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione

sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

5 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti.

6 Posizionare ogni flacone di reagente sul rack nelle posizioni numerate associate. Assicurarsi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

Tabella 5 Posizioni dei reagenti SBS

Posizione	Reagente	Descrizione
1	ICB	Incorporation Mix
2	PW1 (25 ml)	Tampone di lavaggio
3	SRE	Scan Mix Reagent
4	Tampone SBS 1 (SB1)	High Salt Buffer
5	Tampone SBS 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
6	Tampone SBS 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
7	CMR	Cleavage Mix Reagent
8	Tampone SBS 3 (SB3)	Cleavage Buffer

7 Aggiungere 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio al flacone nella posizione 2.

8 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

9 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente per il sequenziamento come segue:
   a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé e abbassare la maniglia.
   b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
   c Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

10 Selezionare la casella di controllo **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 - 25 ml - caricato).

Caricamento dei reagenti di indicizzazione

1 Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

2 Assicurarsi che il rack dei reagenti PE non sia in uso sulla cella a flusso adiacente. I passaggi che usano il rack dei reagenti PE includono risintesi Lettura 2, preparazione Lettura Indice 1 (i7) e preparazione Lettura Indice 2 (i5).

3 Sollevare i pescanti per il rack dei reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:

a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
b Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

4 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.

5 Rimuovere i tappi da ciascuna provetta di reagente e posizionare la provetta sul rack nella posizione numerata associata o facendo corrispondere il colore dell'etichetta.

Tabella 6 Corsa a singola indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale o cella a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
17	HP8 o HP12	Index 1 (i7) Sequencing Primer Mix
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

Tabella 7 Corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
16	HP9	Index 2 (i5) SR Sequencing Primer Mix
17	HP8 o HP12	Index 1 (i7) Sequencing Primer Mix
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

Tabella 8 Corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
10	RMR	Resynthesis Mix
17	HP8 o HP12	Index 1 (i7) Sequencing Primer Mix
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

6 Collocare provette coniche da 15 ml riempite con 10 ml di acqua da laboratorio nelle posizioni non usate del rack.

7 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

8 Abbassare i pescanti nelle provette sul rack dei reagenti PE come segue:
a Tirare la maniglia verso di sé e quindi abbassare la maniglia tirandola verso di sé.
b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.

c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

9 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

10 Selezionare **Next** (Avanti).

Priming dei reagenti

La procedura per il priming dei reagenti include la pulizia del vano portacella, il caricamento di una cella a flusso per il priming, la conferma del flusso corretto e l'avvio del priming.

Pulizia del vano portacella

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

ATTENZIONE
Non porre liquidi sullo sportello dello scomparto della cella a flusso o sul piano portacelle quando lo sportello è aperto. Fuoriuscite di liquido in quest'area possono danneggiare lo strumento.

2 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia in posizione OFF.

Figura 23 Leva della cella a flusso in posizione 0

3 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

4 Se è presente una cella a flusso usata in una corsa precedente, rimuoverla e metterla da parte in una provetta di tampone di conservazione o acqua da laboratorio per evitare che si asciughi. La si può utilizzare per verificare il corretto flusso prima di caricare la cella a flusso con cluster.

5 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

6 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

Figura 24 Posizioni dei fori della pompa a vuoto

Caricamento di una cella a flusso per il priming

Dalla schermata Load Priming Flow Cell (Caricamento cella a flusso per il priming) caricare una cella a flusso ***usata***, per eseguire la fase di priming. Dopo il caricamento di una cella a flusso usata, confermare che la pompa a vuoto sia posizionata correttamente.

NOTA
Illumina consiglia di usare la cella a flusso proveniente da una corsa precedente per il priming dei reagenti su una corsa successiva o per un lavaggio dello strumento post-corsa.

1 Sciacquare con acqua da laboratorio la cella a flusso usata. Asciugare la cella a flusso con una salvietta per la pulizia delle lenti o con un panno che non lascia residui.

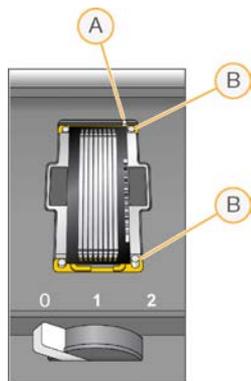
2 Pulire la cella a flusso usando panni imbevuti di alcol e salviette per la pulizia delle lenti.

NOTA
Durante questa fase, non rimuovere o sostituire le guarnizioni della cella a flusso.

3 Collocare la cella a flusso usata sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.

4 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

Figura 25 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

5 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 149.

Figura 26 Leva della cella a flusso in posizione 1

6 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2 (tutto a destra). Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 27 Leva della cella a flusso in posizione 2

7 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata caricamento cella a flusso per il priming e poi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 2 (acqua da laboratorio) dall'elenco a tendina.

ATTENZIONE
Usare acqua per confermare il flusso corretto solo su una cella a flusso usata. Non usare mai acqua per confermare il flusso corretto su una cella a flusso con cluster.

2 Confermare i valori predefiniti seguenti:
   - Volume (Volume): **125**
   - Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
   - Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 125 µl di acqua nella cella a flusso. Se il problema persiste, rimuovere la cella a flusso, ripetere le fasi di pulizia e ricaricare la cella a flusso.

Posizionamento dei tubi e avvio del priming

1 Rimuovere gli otto tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore per gli scarti.
Non includere gli otto tubi per la cella a flusso opposta, o i tubi per la pompa di scarico condensa.

Figura 28 Posizione dei tubi

A Tubi di scarico della cella a flusso per le posizioni 1-8 dei reagenti
B Tubo della pompa di scarico condensa (non rimuovere)

2 Collocare i tubi di scarico in una provetta da 15 ml vuota, un provetta per gli scarti per una provetta da 15 ml. Gli scarti del priming vengono raccolti e misurati dopo la fase di priming.
3 Selezionare **Start Prime** (Avvia priming). Si apre la schermata di priming e si avvia la fase di priming. Monitorare l'avanzamento della fase di priming dall'apposita schermata.
4 Al completamento della fase di priming, misurare gli scarti raccolti e confermare che il volume in ciascuna provetta sia 1,75 ml per un totale di **14 ml**. Il totale viene calcolato come segue:
   - 250 µl per ciascuna posizione SBS, fatta eccezione per la posizione 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
   - 1,75 ml per ciascuna corsia (1,75 x 8 = 14 ml)
5 Registrare i risultati sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
6 Riposizionare i tubi di scarico nel contenitore per gli scarti prima di procedere.
7 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento di una cella a flusso

Le fasi per il caricamento di una cella a flusso con cluster include la rimozione della cella a flusso per il priming, la pulizia del vano portacella, il caricamento della cella a flusso e la conferma del flusso corretto.

Materiali di consumo forniti dall'utente

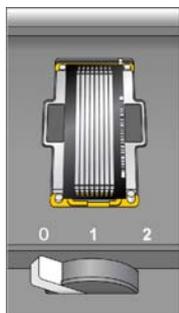
- Panno per la pulizia delle lenti
- Salviette con alcol o etanolo al 70%
- Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle
- Un paio di pinze

Rimozione della cella a flusso usata

1 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per sbloccare i collettori.

Figura 29 Leva della cella a flusso in posizione 1

2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 0 per sbloccare la tenuta del vuoto e rilasciare la cella a flusso.

Figura 30 Leva della cella a flusso in posizione 0

3 Sollevare la cella a flusso usata dal vano portacella.

Pulizia del vano portacella

1 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

2 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

Figura 31 Ispezione dei fori della pompa a vuoto

3 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

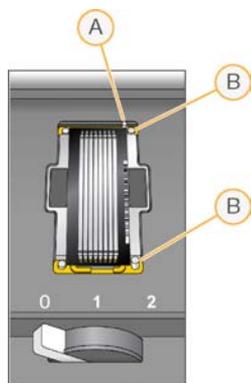
Pulizia della cella a flusso

1. Rimuovere la cella a flusso dal contenitore della cella a flusso usando un paio di pinze.
2. Sciacquare la cella a flusso con acqua da laboratorio e asciugarla con un panno pulente per lenti.
3. Piegare una salvietta imbevuta di alcol fino approssimativamente alle dimensioni della cella a flusso.
4. Tenere i bordi della cella a flusso con cluster con due dita. Assicurarsi che le porte di ingresso e di uscita siano rivolte ***verso l'alto***.
5. Pulire ogni lato della cella a flusso con un unico movimento. Ripetere, ripiegando il panno a ogni passaggio, fino a quando la cella a flusso non è pulita.
6. Asciugare la cella a flusso con un panno pulente per lenti.
7. Proteggere la cella a flusso dalla polvere fino a quando la si carica sullo strumento.

Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

NOTA
Non sostituire le guarnizioni dei collettori. Sostituire le guarnizioni dei collettori dopo il completamento della corsa di sequenziamento e prima del lavaggio di manutenzione.

1. Collocare la cella a flusso sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso punti verso lo strumento.
2. Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 32 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 149.

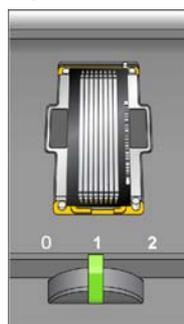
Figura 33 Leva della cella a flusso in posizione 1

4 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2. Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 34 Leva della cella a flusso in posizione 2

5 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata Load Sequencing Flow Cell (Caricamento della cella a flusso di sequenziamento).

Conferma del flusso corretto

La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 5 dall'elenco a tendina.

2 Inserire i valori predefiniti seguenti:
   - Volume (Volume): **250**
   - Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
   - Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie o di perdite vicino ai collettori.
Se sono presenti bolle, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori e ripetere il processo usando la soluzione 6 per evitare di esaurire la posizione 5. Ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl verso la cella a flusso.

5 Selezionare **Next** (Avanti). Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia verde e chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

6 Confermare che le caselle di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate e poi selezionare **Next** (Avanti).
7 Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la corsa di sequenziamento.

Monitoraggio della corsa

Monitorare le metriche della corsa, la fluidica e l'imaging sulla schermata di panoramica della corsa.

Figura 35 Schermata di panoramica della corsa

A **Barra di avanzamento**: utilizzare la barra di avanzamento per monitorare quanti cicli sono stati completati.

B **Grafico della fluidica**: allargare la sezione della fluidica per monitorare le fasi della chimica.

C **Configurazione della corsa**: per rivedere i parametri per la corsa attuale.

D **Grafico dell'analisi**: utilizzare il grafico dell'analisi per monitorare i punteggi qualitativi secondo il ciclo.

E **Grafico delle immagini**: utilizzare il grafico delle immagini per monitorare le intensità secondo il ciclo.

Report sulla prima base

Se durante la procedura di impostazione è stata selezionata l'opzione **Confirm First Base** (Conferma prima base), viene visualizzata automaticamente la finestra di dialogo di conferma relativa all'incorporazione della prima base al termine dell'imaging del primo ciclo. In questa fase la corsa si mette in pausa.

1 Dalla finestra di dialogo di conferma, rivedere First Base Report (Report sulla prima base).

2 Se i risultati sono soddisfacenti, selezionare **Continue** (Continua).

Procedure post-corsa

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti ed eseguire un lavaggio dello strumento. Per maggiori informazioni vedere *Procedure post-corsa* a pagina 115.

Preparazione dei reagenti per la Lettura 2

Prima della conclusione della Lettura 1 e di ogni eventuale Lettura Indici, preparare i reagenti per la risintesi Lettura 2 e ICB fresco per la Lettura 2.

Per le istruzioni sulla preparazione dei reagenti, vedere la *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq PE Cluster Kit v3 (n. codice 15023336).* Questa guida include le istruzioni per la preparazione dei reagenti di sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

NOTA
Per prestazioni ottimali, Illumina raccomanda di preparare ICB (Incorporation Mix) fresco per la Lettura 2.

Caricamento dei reagenti per la Lettura 2

Dopo il completamento della Lettura 1 e di tutte le eventuali Letture Indici, caricare i reagenti paired-end per la risintesi Lettura 2 e ICB da una preparazione fresca per la Lettura 2.

Caricamento dei reagenti PE

1. Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
2. Assicurarsi che il rack dei reagenti PE non sia in uso sulla cella a flusso opposta per la risintesi della Lettura 2, per la preparazione della Lettura Indice 1 (i7), o per la preparazione Lettura Indice 2 (i5).
3. Sollevare i pescanti per il rack dei reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:
   a. Tirare la maniglia verso di sé e sollevare la maniglia.
   b. Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
4. Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.
5. Rimuovere i tappi da ogni provetta di reagente.
6. Posizionare ciascuna provetta di reagente sul rack nelle posizioni numerate associate.

Tabella 9 Posizioni dei reagenti PE

Posizione	Reagente	Descrizione
10	RMR	Resynthesis Mix
11	LMX2	Linearization Mix 2
12	BMX	Blocking Mix
13	AMX2	Amplification Mix 2
14	APM2	AMX2 Premix
15	AT2	100% Formammide
16	HP7 o HP11	Primer sequenziamento Lettura 2
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

NOTA
Per le corse paired-end a doppia indicizzazione, RMR viene caricato con i reagenti di indicizzazione prima dell'avvio della corsa. Per le corse a singola indicizzazione o non indicizzate, RMR viene caricato con i reagenti paired-end.

7. Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.
8. Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente PE come segue:
   a. Tirare la maniglia verso di sé e abbassare la maniglia.
   b. Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
   c. Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

Caricamento di ICB per la Lettura 2

1. Registrare il peso del reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
2. Sollevare i pescanti per il rack reagenti per il sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:
   a. Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
   b. Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
3. Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti.
4. Rimuovere il flacone di reagente ICB esistente dalla posizione 1 del rack reagenti e rimuovere il tappo a imbuto dal flacone.
5. Collocare il tappo a imbuto sul nuovo flacone di ICB e caricare il flacone nella posizione 1. Assicurarsi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.
6. Far scorrere il rack reagenti nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.
7. Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente per il sequenziamento come segue:

a. Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé e quindi abbassare la maniglia.
b. Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
c. Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

8. Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti e poi selezionare **Next** (Avanti) per riprendere la corsa.

Esecuzione di una corsa Rapid Run (Corsa rapida)

Capitolo 4

Introduzione

La modalità Rapid Run (Corsa rapida) fornisce due opzioni per la fase di generazione di cluster, su cBot o su HiSeq 2500. La generazione di cluster su cBot consente due librerie, una per ciascuna corsia su una cella a flusso rapida a due corsie. Dopo l'ibridazione del templato e la prima estensione su cBot, il restante processo di generazione di cluster viene eseguito su HiSeq.

Dopo la preparazione dei reagenti, la procedura di impostazione della corsa include l'immissione dei parametri della corsa, il caricamento e il priming dei reagenti, il caricamento della cella a flusso e l'esecuzione della verifica della fluidica. Se la generazione di cluster è eseguita su HiSeq 2500, la fase di priming dei reagenti è omessa dalla procedura di impostazione della corsa.

Per informazioni relative alla durata della corsa e altre specifiche delle prestazioni, visitare la pagina delle specifiche di HiSeq 2500 sul sito Web Illumina.

Materiali di consumo per il sequenziamento Rapid Run (Corsa rapida)

Nome del kit per Rapid Run (Corsa rapida)	Descrizione
HiSeq Rapid SBS Kit v2 o TruSeq Rapid SBS Kit (v1)	Contiene i reagenti SBS usati su HiSeq 2500 e i tappi a imbuto per i flaconi di reagente.
HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 or HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 oppure TruSeq Rapid PE Cluster Kit (v1) o TruSeq Rapid SR Cluster Kit (v1)	Contiene i reagenti per la generazione di cluster e per l'indicizzazione utilizzati su HiSeq 2500 e un set di guarnizioni della cella a flusso. Le versioni PE dei kit per la generazione di cluster includono i reagenti paired-end usati su HiSeq 2500.

Procedura per la preparazione dei reagenti

Prima di impostare la corsa, preparare i reagenti SBS, i reagenti di indicizzazione e i reagenti PE.

- Per la preparazione dei reagenti SBS, consultare la guida appropriata:

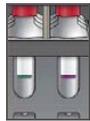
- *Guida di preparazione dei reagenti di HiSeq Rapid SBS Kit v2 (n. codice 15058772)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq Rapid SBS Kit (200 cicli) (n. codice 15036501)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq Rapid SBS Kit (50 cicli) (n. codice 15036502)*
- Per la preparazione dei reagenti di indicizzazione e PE, consultare la guida appropriata:
  - *Guida di preparazione dei reagenti di HiSeq Rapid Cluster Kit v2 (n. codice 15059131)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq Rapid PE Cluster Kit (n. codice 15038861)*
  - *Guida di preparazione dei reagenti di TruSeq Rapid SR Cluster Kit (n. codice 15038860)*

Preparare tutti i reagenti prima di impostare la corsa. Quando suggerito dal software di controllo, caricare tutti i reagenti. Quando si usa la chimica per la corsa rapida, non è necessario tornare allo strumento durante la corsa per caricare i reagenti.

Flusso di lavoro del sequenziamento Rapid Run (Corsa rapida)

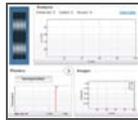
Preparare tutti i reagenti per la corsa e preparare il templato della libreria.

Per informazioni sulla preparazione dei reagenti, vedere *Procedura per la preparazione dei reagenti* a pagina 84.

Utilizzando il software di controllo, eseguire una verifica del volume e immettere i parametri della corsa.

Per la generazione di cluster integrata sullo strumento: caricare tutti i reagenti per la corsa e preparare il templato della libreria.

Per la generazione di cluster su cBot: caricare tutti i reagenti per la corsa.

Con una cella a flusso usata sullo strumento, confermare il flusso corretto.

Per la generazione di cluster su cBot: eseguire il priming dei reagenti SBS e misurare lo scarto del priming.

Avviare la corsa di sequenziamento. Dopo il ciclo 1, ispezionare il report sulla prima base (impostazione opzionale) e poi proseguire la Lettura 1.

La corsa di sequenziamento continua su PE e Lettura 2 senza alcun intervento.

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti. Eseguire un lavaggio post-corsa con acqua.

Tipi di corsa per la chimica Rapid Run (Corsa rapida)

Le tabelle seguente mostrano i tipi di corse di sequenziamento e il numero di cicli possibili per ciascuna lettura utilizzando la chimica per la corsa rapida. Utilizzare queste informazioni come riferimento quando si imposta la corsa.

Tabella 10 HiSeq Rapid SBS Kit v2

Tipo di corsa	Cicli Lettura 1	Cicli di lettura Indice 1 (i7)	Cicli di lettura Indice 2 (i5)	Cicli Lettura 2	Cicli totali
Unidirezionale, non indicizzata	≤ 251	--	--	--	≤ 251
Unidirezionale, singola indicizzazione	≤ 251	7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 258 [1] ≤ 259 [2]
Unidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 251	8	8	--	≤ 267
Paired-end, non indicizzata	≤ 251	--	--	≤ 251	≤ 502
Paired-end, singola indicizzazione	≤ 251	7 [1] 8 [2]	--	≤ 251	≤ 509 [1] ≤ 510 [2]
Paired-end, doppia indicizzazione	≤ 251	8	7 + 8 [3]	≤ 251	≤ 525

Tabella 11 TruSeq Rapid SBS Kit (v1)

Tipo di corsa	Cicli Lettura 1	Cicli di lettura Indice 1 (i7)	Cicli di lettura Indice 2 (i5)	Cicli Lettura 2	Cicli totali
Unidirezionale, non indicizzata	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Unidirezionale, singola indicizzazione	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 108 [1] ≤ 109 [2]
Unidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 101	8	8	--	≤ 117
Paired-end, non indicizzata	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
Paired-end, singola indicizzazione	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	≤ 101	≤ 209 [1] ≤ 210 [2]
Paired-end, doppia indicizzazione	≤ 101	8	7 + 8 [3]	≤ 101	≤ 225

[1] Numero di cicli per librerie con singola indicizzazione
[2] Numero di cicli per librerie con doppia indicizzazione
[3] La Lettura Indice 2 di una corsa paired-end con doppia indicizzazione include sette cicli addizionali di sola chimica

Verifica del volume pre-corsa

Dalla schermata Welcome (Benvenuto) del software, selezionare **Sequence | New Run** (Sequenzia | Nuova corsa). Si apre la schermata Volume Check (Verifica volume).

Schermata Volume Check (Verifica volume)

1. Quando il software suggerisce di eseguire una verifica del volume, selezionare **Yes** (Sì).
2. Posizionare i tubi di scarico 1, 2, 3, 6, 7 e 8 per la cella a flusso in uso in un flacone da 1 litro riempito con acqua deionizzata. Mettere i tubi in acqua deionizzata impedisce di danneggiare le pompe dei reagenti.
3. Caricare acqua da laboratorio in tutte le otto posizioni SBS, 10 posizioni sul rack dei reagenti PE e la posizione della libreria per la cella a flusso in uso.
4. Chiudere la stazione di caricamento.
5. Selezionare la casella di controllo **Water loaded and template loading station closed** (Acqua caricata e stazione di caricamento del templato chiusa).
6. Selezionare **Next** (Avanti).
7. Accertarsi che sullo strumento sia caricata una cella a flusso per corsa rapida usata. Immettere l'ID della cella a flusso in uso.
8. Selezionare **Next** (Avanti).
9. Selezionare **Pump** (Pompa) per confermare il flusso.
10. Posizionare i tubi 4 e 5 in provette coniche vuote da 15 ml separate.
11. Selezionare **Next** (Avanti). Ha inizio la verifica del volume.
    Al termine della verifica, il volume previsto è di 9,5 ml ±10% per ciascun tubo.
12. Rimettere tutti i tubi nel flacone degli scarti.
13. Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento dei parametri della corsa

Dalla schermata Welcome (Benvenuto) del software, selezionare **Sequence | New Run** (Sequenzia | Nuova corsa).

L'interfaccia del software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione della corsa. Il processo di impostazione della corsa è organizzato in tre schede: Run Configuration, Pre-Run Setup e Initiate Run (Configurazione corsa, Impostazioni pre-corsa e Avvio corsa).

- Le schermate di configurazione della corsa contengono elenchi a tendina, caselle di controllo o campi di testo per i parametri della corsa. Usare lo scanner portatile per codici a barre per scansionare l'ID della cella a flusso o del kit di reagenti, oppure inserire l'ID utilizzando la tastiera di tipo touch screen. L'icona della tastiera si trova a destra dei campi per il testo.
- Selezionare **Next** (Avanti) per passare alla schermata successiva o selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata precedente.
- In qualunque momento durante la procedura di impostazione della corsa, è possibile selezionare **Cancel** (Annulla) per uscire dall'impostazione della corsa e tornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Schermata Integration (Integrazione)

La schermata Integration (Integrazione) fornisce l'opzione di collegare la corsa a BaseSpace.

Per collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1. Selezionare **BaseSpace**.
2. Selezionare da una delle seguenti opzioni BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Archiviazione e analisi): invia i dati della corsa a BaseSpace per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati. Con questa opzione, è richiesto un foglio campioni.
   - **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia solo i file InterOp a BaseSpace, che permettono di monitorare la corsa in remoto.
3. Accedere a BaseSpace utilizzando l'e-mail e la password dell'account MyIllumina.
4. Selezionare **Next** (Avanti).

Per proseguire senza collegarsi a BaseSpace, attenersi a quanto segue:

1 Selezionare **None** (Nessuno).
2 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Storage (Archiviazione)

1 Selezionare la casella di controllo **Save to an output folder** (Salva in una cartella di output) e selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare a una posizione della rete preferita. Se per l'archiviazione e l'analisi la corsa è collegata a BaseSpace, questo campo è facoltativo.
2 Selezionare **Zip BCL files** (Comprimi file BCL) per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Se la corsa è collegata a BaseSpace, l'opzione **Zip BCL files** (Comprimere file BCL) è selezionata per impostazione predefinita.

NOTA
L'impostazione **Bin Q-Scores** (Raggruppa punteggi qualitativi) è attivata per impostazione predefinita per ridurre lo spazio di archiviazione richiesto. Questa impostazione raggruppa i punteggi qualitativi su un intervallo di valori più ampio senza incidere su accuratezza o prestazioni.

3 Selezionare dalle opzioni Save Auxiliary Files (Salva file ausiliari) seguenti:
   - **Save All Thumbnails** (Salva tutte le miniatura): salva tutte le immagini in miniatura. Un'immagine in miniatura è una campionatura di immagini da diverse tile in ciascuna colonna di tile o striscia, combinata in un'immagine in miniatura.
   - **Save Tile Thumbnails** (Salva miniature delle tile): salva le immagini in miniatura delle tile. Le immagini in miniatura delle tile rappresentano una singola tile piuttosto che un campionamento di tile in una striscia.
4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso)

La schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso) registra le informazioni sulla cella a flusso utilizzata per la corsa.

1 Selezionare un tipo di kit di reagenti, **TruSeq Rapid v1** o **HiSeq Rapid v2**.

2 Eseguire la scansione del codice a barre della cella a flusso o inserire l'ID (numero del codice a barre) della cella a flusso da sottoporre a sequenziamento. L'ID della cella a flusso è usata per determinare il tipo di cella a flusso e la compatibilità dei reagenti.

3 Confermare che il tipo di cella a flusso sia corretta, **TruSeq Rapid Flow Cell v1** o **HiSeq Rapid Flow Cell v2**. Il tipo di cella a flusso viene selezionato automaticamente in base all'ID della cella a flusso.

4 Inserire un nome per l'esperimento. Il nome dell'esperimento appare su ciascuna schermata per permettere di identificare la corsa in esecuzione.

5 Inserire un nome utente.

6 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Advanced (Avanzato)

1 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Confirm First Base** (Conferma incorporazione prima base).
Un report sulla prima base viene generato automaticamente per ciascuna corsa. La selezione di questa opzione apre il report sulla prima base prima di procedere con la corsa.

2 [Opzionale] Dalle caselle di controllo **Align to PhiX** (Allineamento con PhiX), deselezionare la casella di controllo per le corsie che non contengono PhiX.
Come impostazione predefinita, tutte le corsie sono selezionate per l'allineamento tramite il software Real-Time Analysis (RTA).
In alternativa, selezionare le corsie sull'immagine della cella a flusso per aggiungere o rimuovere le corsie per l'allineamento PhiX.

NOTA
Con HCS v2.2 e RTA v1.18 non è richiesta una corsia di controllo dedicata. Quindi, l'opzione per assegnare una corsia di controllo non è disponibile con questa configurazione software.

3 [Opzionale] [Per TruSeq Rapid v1]Selezionare **Keep Intensity Files** (Mantieni i file intensità) per la ripetizione dell'analisi successivamente o l'elaborazione personalizzata.
Come impostazione predefinita, questa opzione non è selezionata. Il salvataggio dei file delle intensità non è necessario per le analisi integrate sullo strumento. L'attivazione di

questa opzione aumenta significativamente la dimensione della cartella di output dei dati.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Recipe (Ricetta)

In base alle informazioni inserite nella schermata Recipe (Ricetta), viene generata automaticamente una ricetta.

1 Selezionare dalle seguenti opzioni per Index Type (Tipo indice):
   - **No Index** (Nessun indice): esegue una corsa non indicizzata unidirezionale oppure paired-end.
   - **Single Index** (Singolo indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con una lettura di indicizzazione.
   - **Dual Index** (Doppio indice): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con due letture di indicizzazione.
   - **Custom** (Personalizzata): esegue una corsa unidirezionale oppure paired-end con un numero di cicli personalizzato per le letture indici.

2 Se è stata specificata l'opzione Dual Index (Doppio indice) o Custom (Personalizzato), selezionare un Flow Cell Format (Formato cella a flusso), **Single Read** (Singola lettura) o **Paired End** (Paired-end).

3 Immettere il numero di cicli per Lettura 1 e Lettura 2, se applicabile.

NOTA
Il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, per eseguire 100 cicli per la Lettura 1, inserire 101.

Per l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzato), immettere il numero di cicli per le letture indici. Le lunghezze delle letture non devono essere identiche.

4 Confermare le impostazioni della chimica seguenti. Questi campi sono popolati automaticamente in base al tipo di kit di reagenti e all'opzione del formato della cella a flusso selezionati.
   a **SBS**: **TruSeq Rapid SBS Kit v1** o **HiSeq Rapid SBS Kit v2**
   b **Cluster Kit (Kit Cluster)**: **TruSeq Rapid PE Cluster Kit v1**, **TruSeq Rapid SR Cluster Kit v1**, **HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2** o **HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2**

5 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) per usare una ricetta personalizzata. Altrimenti, permettere al software di

creare la ricetta in base ai parametri della corsa inseriti.

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

I fogli campioni sono opzionali a meno che non si usi BaseSpace per eseguire l'analisi dei dati, eseguire una corsa di indicizzazione o pianificare il monitoraggio delle prestazioni per il de-multiplexing utilizzando il software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Per ulteriori informazioni, vedere *Guida per l'utente del software Sequencing Analysis Viewer (SAV), (n. codice 15020619)*.

1. Selezionare dalle opzioni seguenti per specificare il metodo di generazione di cluster:
   - Selezionare **On-Board Cluster Generation** (Generazione di cluster sullo strumento) per eseguire la generazione di cluster integrata sullo strumento.
   - Se la generazione di cluster è stata avviata su cBot, selezionare **Template Hybridization on cBot** (Ibridazione templato su cBot).
2. Selezionare **Next** (Avanti).
3. Nel campo Sample Sheet (Foglio campioni), selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione del foglio campioni.
4. Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Reagents (Reagenti)

La schermata Reagents (Reagenti) registra informazioni sui kit di reagenti utilizzati per la corsa. L'ID del kit di reagenti (numero del codice a barre che inizia con **RGT**) viene utilizzato per determinare il tipo di kit di reagenti e la compatibilità con la modalità della corsa.

1. Eseguire la scansione o immettere l'ID del kit di reagenti SBS.
2. Per le corse paired-end, scansionare o inserire l'ID del kit di reagenti per il kit cluster.
3. Selezionare il kit di reagenti SBS per la corsa:
   - [Per HiSeq Rapid SBS Kit v2] Selezionare **500 Cycles** (500 cicli) per un kit da 500 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 525 cicli rimanenti.
   - Selezionare **200 Cycles** (200 cicli) per un kit da 200 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 225.
   - Selezionare **50 Cycles** (50 cicli) per un kit da 50 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 74.

- Selezionare **Custom** (Personalizza) per un kit parziale o kit multipli da 50 cicli. Nel campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti), inserire il numero di cicli SBS per i quali si prevede che i reagenti dureranno.

NOTA
Per i kit parziali, il software esegue un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Review (Revisione)

1 Rivedere i parametri della corsa dalla schermata Review (Revisione).

2 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere o selezionare **Back** (Indietro) per modificare i parametri.

Caricamento e priming dei reagenti

Dopo aver immesso i parametri della corsa, caricare i reagenti SBS, per la generazione di cluster, di indicizzazione e paired-end per la corsa, e quindi eseguire il priming dei reagenti nel sistema di fluidica. Il software guida l'utente in questo processo tramite una serie di schermate sulla scheda Pre-Run Setup (Impostazioni pre-corsa).

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Otto tappi a imbuto

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Flacone da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Provette coniche da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Acqua da laboratorio

NOTA

Per preparare il risciacquo post-corsa al termine di una corsa di sequenziamento, caricare 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio nella posizione 2.

Il risciacquo post-corsa ***non*** sostituisce il lavaggio post-corsa dello strumento.

Preparazione dei reagenti SBS e per la generazione di cluster

Assicurarsi che i reagenti SBS siano pronti per essere caricamenti sullo strumento.

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Otto tappi a imbuto

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Un flacone da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Una provetta Eppendorf con tappo flip-top per ogni cella a flusso (da 1,5 ml o 1,7 ml). Non utilizzare provette con tappi a vite.

Procedura

1. Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
2. Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.

3 Sollevare i pescanti per il rack reagenti per il sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé e quindi sollevare la maniglia.
   b Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

4 Far scorrere il rack reagenti SBS fuori dallo scomparto reagenti.

5 Rimuovere il tappo da ciascun flacone di reagente e sostituirlo con un tappo a imbuto. Sostituire il tappo del flacone CRM per ultimo e poi sostituire i guanti.

6 Posizionare ciascun flacone di reagente SBS sul rack nelle posizioni numerate associate. Assicurarsi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

Tabella 12 Posizioni del reagente HiSeq Rapid v2 SBS

Posizione	Reagente	Descrizione
1	IMT	Incorporation Master Mix
2	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
3	USM	Universal Scan Mix
4	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
5	USB	Tampone di sequenziamento universale
6	USB	Tampone di sequenziamento universale
7	CRM	Cleavage Reagent Master Mix
8	CWM	Cleavage Wash Mix

Tabella 13 Posizioni del reagente TruSeq Rapid (v1) SBS

Posizione	Reagente	Descrizione
1	IMM	Incorporation Master Mix
2	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
3	SRM	Scan Reagent Master Mix
4	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
5	USB	Tampone di sequenziamento universale
6	USB	Tampone di sequenziamento universale
7	CRM	Cleavage Reagent Master Mix
8	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio

7 Caricare 25 ml di PW1 o acqua da laboratorio nelle posizioni seguenti:

- Per HiSeq Rapid SBS Kit v2: posizioni 2 e 4.
- Per TruSeq Rapid SBS Kit: posizioni 2, 4 e 8.

8 Far scorrere il rack SBS nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

9 Selezionare la casella di controllo **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 - 25 ml - caricato).

10 Far scorrere il rack dei reagenti PE fuori dallo scomparto reagenti.

11 Rimuovere i tappi da ogni provetta di reagente e posizionare la provetta sul rack nella posizione numerata associata.

Tabella 14 Cella a flusso unidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
10	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
11	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
12	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
13	AMS	Fast Amplification Mix
14	FPM	Fast Premix
15	FDR	Fast Denaturation Reagent (contiene formammide)
16	HP9 *	Primer indice i5
17	HP12*	Primer indice i7
18	HP10	Primer Lettura 1
19	FLS	Fast Linearization Solution

* HP9 è richiesto solo per le corse a doppia indicizzazione. HP12 è richiesto per tutte le opzioni di indicizzazione. Se HP9 e HP12 non sono utilizzati, caricare una provetta conica da 15 ml con 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio nella posizione 16 per HP9 e nella posizione 17 per HP12.

Tabella 15 Cella a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
10	FRM	Fast Resynthesis Mix
11	FLM2	Fast Linearization Mix 2 (Lettura 2)
12	FLM1	Fast Linearization Mix 1 (Lettura 1)
13	AMS	Fast Amplification Mix
14	FPM	Fast Premix
15	FDR	Fast Denaturation Reagent (contiene formammide)
16	HP11	Primer Lettura 2
17	HP12*	Primer indice i7

Posizione	Reagente	Descrizione
18	HP10	Primer Lettura 1
19	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio

* HP12 è richiesto solo per le corse indicizzate. Se HP12 non viene usato, caricare una provetta conica da 15 ml riempita con 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio nella posizione 17.

12 Aggiungere 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio alle provette coniche da 15 ml nelle posizioni seguenti:
- Corsa paired-end: posizione 19
  Non indicizzata: posizione 17
- Corsa unidirezionale: posizioni 10, 11 e 12
  Non indicizzata: posizione 16 e 17

13 Far scorrere i rack dei reagenti PE nello scomparto reagenti, allineando i rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

14 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente per il sequenziamento come segue:
   a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé e abbassare la maniglia.
   b Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
   c Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

Caricamento dei templati

Caricare il templato della libreria per la generazione di cluster sullo strumento. Per istruzioni sulla preparazione della libreria, vedere *Denaturazione e diluizione delle librerie per HiSeq e GAIIx (n. codice 15050107)*.

NOTA
Se cBot è stato utilizzato per la generazione di cluster, collocare due provette Eppendorf riempite con 1 ml di acqua deionizzata nella stazione di caricamento invece di attenersi alle istruzioni seguenti.

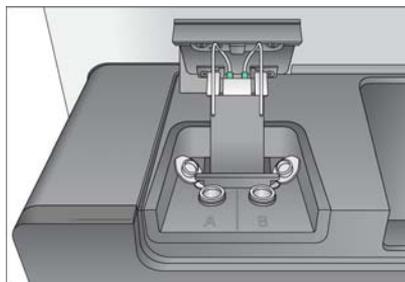
1 Aggiungere 420 µl di templato della libreria preparato in una provetta Eppendorf da 1,5 ml o 1,7 ml.

2 Caricare il templato nella stazione di caricamento, come qui di seguito indicato:

a Sollevare lo sportello della stazione di caricamento.

b Rimuovere la provetta Eppendorf contenente acqua e sostituirla con una provetta Eppendorf contenente 420 µl di templato di libreria preparato.

c Fissare i coperchi sotto la barra dietro le provette per evitare di interferire con i pescanti.

Figura 36 Stazione di caricamento

NOTA
Il liquido che rimane nella provetta dopo la corsa è altamente diluito e non è adatto per uso futuro.

d Chiudere lentamente lo sportello della stazione di caricamento, assicurarsi che i pescanti siano allineati correttamente con le provette Eppendorf quando il coperchio è chiuso.

3 Selezionare la casella di controllo **Template loaded and template loading station closed** (Templato caricato e stazione di caricamento del templato chiusa).

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Priming dei reagenti

NOTA
Eseguire il priming dei reagenti solo se è stato usato HiSeq o TruSeq Rapid Duo Sample Loading Kit per eseguire l'ibridazione del templato su cBot. In caso contrario, saltare il priming dei reagenti e passare a *Caricamento di una cella a flusso* a pagina 106.

La procedura per il priming dei reagenti include la pulizia del vano portacella, il caricamento di una cella a flusso usata, la conferma del flusso corretto e l'avvio del priming.

Pulizia del vano portacella

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

ATTENZIONE

Non porre liquidi sullo sportello dello scomparto della cella a flusso o sul piano portacelle quando lo sportello è aperto. Fuoriuscite di liquido in quest'area possono danneggiare lo strumento.

2 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia in posizione OFF.

Figura 37 Leva della cella a flusso in posizione 0

3 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

4 Se è presente una cella a flusso usata in una corsa precedente, rimuoverla e metterla da parte in una provetta di tampone di conservazione o acqua da laboratorio per evitare che si asciughi. La si può utilizzare per verificare il corretto flusso prima di caricare la cella a flusso con cluster.

5 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE

Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

6 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

Figura 38 Posizioni dei fori della pompa a vuoto

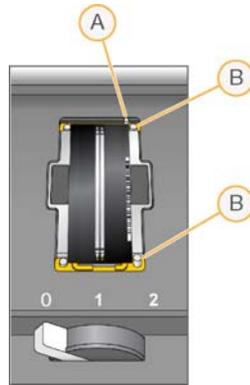
Caricamento di una cella a flusso per il priming

NOTA
Per il priming dei reagenti utilizzare una cella a flusso usata. Non utilizzare la cella a flusso che si desidera sottoporre a sequenziamento.

1. Sciacquare con acqua da laboratorio una cella a flusso usata. Asciugarla con salviette per la pulizia delle lenti o con un panno che non lascia residui.
2. Pulire la cella a flusso usando panni imbevuti di alcol e salviette per la pulizia delle lenti.

NOTA
Non rimuovere o sostituire le guarnizioni del collettore.

3. Collocare la cella a flusso sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.
4. Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 39 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

5 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso è verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente.

Figura 40 Leva della cella a flusso in posizione 1

6 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2 (tutto a destra). Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 41 Leva della cella a flusso in posizione 2

7 Immettere l'ID della cella a flusso.

NOTA
Per il priming è possibile utilizzare una cella a flusso TruSeq Rapid o una cella a flusso HiSeq Rapid v2.

8 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata caricamento cella a flusso per il priming e poi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

Dopo aver caricato la cella a flusso usata, verificare il flusso corretto. La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 2 (acqua da laboratorio) dall'elenco a tendina.

ATTENZIONE
Usare acqua per confermare il flusso corretto solo su una cella a flusso usata. Non usare mai acqua per confermare il flusso corretto su una cella a flusso con cluster.

2 Confermare i valori predefiniti seguenti:
- Volume (Volume): **250**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **1500**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.

Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni, ridurre la velocità di aspirazione a 1000 e pompare altri 250 µl di acqua nella cella a flusso. Se il problema persiste, rimuovere la cella a flusso, ripetere le fasi di pulizia e ricaricare la cella a flusso.

Posizionamento dei tubi e priming dei reagenti

1. Allentare e rimuovere i tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore per gli scarti. Non includere gli otto tubi per la cella a flusso opposta, o i tubi per la pompa di scarico condensa.
2. Posizionare i tubi 4 e 5 in provette separate da 15 ml.
3. Posizionare i tubi 1, 2, 3, 6, 7 e 8 in un flacone contenente acqua da laboratorio.
4. Selezionare **Next** (Avanti).
5. Selezionare **Start Prime** (Avvia priming) per avviare il priming. È possibile monitorare l'avanzamento della fase di priming dalla schermata Prime (Priming).
6. Al completamento della fase di priming, misurare gli scarti di priming raccolti e confermare che il volume sia 2,5 ml ±10%, che rappresenta 500 µl per reagente, per corsia. Registrare i risultati sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
7. Prima di procedere, riportare i tubi 4 e 5 nel contenitore per gli scarti. Lasciare i tubi di scarico 1, 2, 3, 6, 7 e 8 nel flacone contenente acqua da laboratorio.
8. Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento di una cella a flusso

La fase successiva consiste nel rimuovere la cella a flusso usata e nel caricare la cella a flusso che si desidera sequenziare.

NOTA
Se cBot era stato utilizzato per la generazione di cluster, caricare una cella a flusso con cluster. Per la generazione di cluster integrata sullo strumento, caricare una nuova cella a flusso.

Rimozione della cella a flusso usata

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

Figura 42 Leva della cella a flusso in posizione 1

2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per sbloccare i collettori.

3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 0 per sbloccare la tenuta del vuoto e rilasciare la cella a flusso.

Figura 43 Leva della cella a flusso in posizione 0

4 Sollevare la cella a flusso usata dal vano portacella.

Pulizia del vano portacella

1 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

2 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

Figura 44 Ispezione dei fori della pompa a vuoto

3 Ispezionare visivamente il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

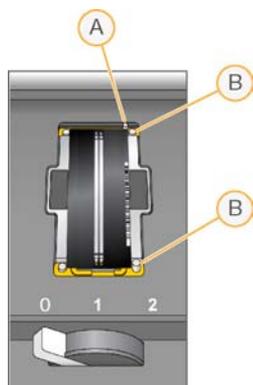
Pulizia della cella a flusso

1. Rimuovere la cella a flusso dal contenitore della cella a flusso usando un paio di pinze.
2. Sciacquare la cella a flusso con acqua da laboratorio e asciugarla con un panno pulente per lenti.
3. Piegare una salvietta imbevuta di alcol fino approssimativamente alle dimensioni della cella a flusso.
4. Tenere i bordi della cella a flusso con cluster con due dita. Assicurarsi che le porte di ingresso e di uscita siano rivolte ***verso l'alto***.
5. Pulire ogni lato della cella a flusso con un unico movimento. Ripetere, ripiegando il panno a ogni passaggio, fino a quando la cella a flusso non è pulita.
6. Asciugare la cella a flusso con un panno pulente per lenti.
7. Proteggere la cella a flusso dalla polvere fino a quando la si carica sullo strumento.

Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

NOTA
Non sostituire le guarnizioni dei collettori. Sostituire le guarnizioni dei collettori dopo il completamento della corsa di sequenziamento e prima del lavaggio di manutenzione.

1. Collocare la cella a flusso sul vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso ***il basso*** e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.
2. Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 45 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro

A Perno guida superiore
B Perni guida destri

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di attivare l'interruttore della pompa a vuoto per prevenire possibili perdite di allineamento nel tempo.

3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso è verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente.

Figura 46 Leva della cella a flusso in posizione 1

4 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2. Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 47 Leva della cella a flusso in posizione 2

5 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata Load Sequencing Flow Cell (Caricamento della cella a flusso di sequenziamento).

Conferma del flusso corretto

1 Selezionare la soluzione 5 (USB) dall'elenco a tendina.

2 Assicurarsi che vengano inseriti i seguenti valori predefiniti:
- Volume (Volume): **250**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **1500**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Assicurarsi che i tubi di scarico di uscita 1, 2, 3, 6, 7 e 8 siano in un flacone di acqua pulita e che i tubi 4 e 5 siano nel contenitore per gli scarti.

4 Selezionare **Pump** (Pompa).

5 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori e ripetere il processo.
   a Selezionare la soluzione 6 (USB) per evitare di esaurire l'USB dalla posizione 5.
   b Ridurre la velocità dell'aspirato a 1000 e pompare altri 250 µl di USB verso la cella a flusso.

6 Dopo aver confermato il flusso corretto, selezionare **Next** (Avanti) per procedere.

7 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia verde e chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

8 Confermare che le caselle di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate e poi selezionare **Next** (Avanti).

9 Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la corsa di sequenziamento.

Monitoraggio della corsa

Monitorare le metriche della corsa, la fluidica e l'imaging sulla schermata di panoramica della corsa.

Figura 48 Schermata di panoramica della corsa

- A **Barra di avanzamento**: utilizzare la barra di avanzamento per monitorare quanti cicli sono stati completati.
- B **Grafico della fluidica**: allargare la sezione della fluidica per monitorare le fasi della chimica.
- C **Configurazione della corsa**: per rivedere i parametri per la corsa attuale.
- D **Grafico dell'analisi**: utilizzare il grafico dell'analisi per monitorare i punteggi qualitativi secondo il ciclo.
- E **Grafico delle immagini**: utilizzare il grafico delle immagini per monitorare le intensità secondo il ciclo.

Report sulla prima base

Se durante la procedura di impostazione è stata selezionata l'opzione **Confirm First Base** (Conferma prima base), viene visualizzata automaticamente la finestra di dialogo di conferma relativa all'incorporazione della prima base al termine dell'imaging del primo ciclo. In questa fase la corsa si mette in pausa.

1. Dalla finestra di dialogo di conferma, rivedere First Base Report (Report sulla prima base).
2. Se i risultati sono soddisfacenti, selezionare **Continue** (Continua).

Procedure post-corsa

Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti ed eseguire un lavaggio dello strumento. Per maggiori informazioni vedere *Procedure post-corsa* a pagina 115.

Procedure post-corsa

Capitolo 5

Introduzione

Le procedure post-corsa includono la rimozione e la pesatura dei reagenti e un lavaggio dello strumento. Un lavaggio con acqua è richiesto dopo ciascuna corsa, con l'opzione di eseguire un lavaggio di manutenzione al posto di un lavaggio con acqua dopo una corsa ad output elevato. Illumina raccomanda un lavaggio di manutenzione.

I lavaggi eseguiti regolarmente assicurano la continuità della resa prestazionale dello strumento per i seguenti motivi:

- Eliminano gli eventuali residui di reagenti e campione dai tubi della fluidica e dai pescanti.
- Impediscono l'accumulo e la cristallizzazione dei sali nei tubi della fluidica e nei pescanti.
- Previene la contaminazione incrociata dalla corsa precedente, inclusa la contaminazione incrociata dopo il passaggio di modalità.

NOTA

Un lavaggio con acqua eseguito al termine di ciascuna corsa lava il sistema e verifica la fluidica. Quando si imposta una corsa, il software conferma che è stato eseguito un lavaggio con acqua o un lavaggio di manutenzione entro le ultime 24 ore. Un lavaggio di manutenzione è richiesto ogni 10 giorni. Quando sono passati 10 giorni dall'ultimo lavaggio di manutenzione, il software chiede di eseguire un lavaggio di manutenzione.

Rimozione e pesatura dei reagenti

1 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.

2 Sollevare i pescanti per il rack SBS e il rack dei reagenti PE appropriato procedendo come segue:
   a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso l'esterno.
   b Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione mentre si tira verso l'esterno.
   c Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.

3 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.

4 Rimuovere ogni flacone dal rack reagenti e registrare il peso sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
   Consultare la pagina di supporto HiSeq 2500 sul sito Web Illumina e scaricare un modulo di monitoraggio del laboratorio.

5 Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): rimuovere le provette dalla stazione di caricamento della libreria.

AVVERTENZA
Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti. Per maggiori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione

Un lavaggio di manutenzione è richiesto ogni 10 giorni o quando si passa dalla modalità ad output elevato alla modalità a corsa rapida e viceversa ed è un'opzione dopo una corsa ad output elevato. Illumina raccomanda di eseguire un lavaggio di manutenzione dopo una corsa ad output elevato.

La schermata Load Gasket (Caricamento guarnizioni) si apre con un lavaggio di manutenzione ogni 10 giorni o quando si passa dalla modalità a corsa rapida alla modalità ad output elevato e viceversa. Prima di procedere con il lavaggio, sostituire la guarnizione a 10 porte nel collettore anteriore e la guarnizione a 8 porte nel collettore posteriore, anche se la schermata non viene visualizzata.

Un lavaggio di manutenzione consiste di un lavaggio del sistema con Tween 20 e ProClin 300.

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Salviette imbevute di etanolo
- Otto flaconi da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- 10 provette da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Per le corse Rapid Run (Corsa rapida): 1 provetta Eppendorf per cella a flusso per il lavaggio della stazione di caricamento
- Acqua da laboratorio
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949)
- ProClin 300 (Sigma-Aldrich, n. di catalogo 48912-U)

Preparazione della soluzione di lavaggio

Preparare 5 litri di soluzione di lavaggio di manutenzione da utilizzare con uno strumento. La soluzione può essere utilizzata per un massimo di tre volte e conservata per un massimo di 30 giorni a temperatura ambiente.

NOTA
Smaltire la soluzione di lavaggio in conformità alle norme di sicurezza in vigore localmente.

1 Preparare 250 ml di 10% Tween 20 combinando i volumi seguenti, aggiungendo per prima l'acqua:
   - Acqua da laboratorio (225 ml)
   - Tween 20 (25 ml)
2 Collocare una barra di agitazione in una damigiana da almeno 6 litri.
3 Combinare i volumi seguenti nella damigiana, aggiungendo per prima l'acqua:
   - Acqua da laboratorio (750 ml)
   - 10% Tween 20 (250 ml)
   - ProClin 300 (1,5 ml)

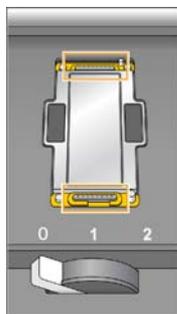
   Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio di circa Tween 20 2,5% e ProClin 300 0,15%.
4 Posizionare la damigiana su un agitatore e agitare fino a quando la soluzione è completamente miscelata.
5 Aggiungere alla soluzione 4 litri di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio di circa Tween 20 0,5% e ProClin 300 0,03%.
6 Continuare ad agitare fino a quando la soluzione è completamente miscelata.
7 Mettere da parte in un contenitore chiuso a temperatura ambiente fino a quando si è pronti a riempire o rabboccare i flaconi e le provette di reagente con la soluzione di lavaggio.

Lavaggio con Tween 20 e ProClin 300

1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Maintenance** (Lavaggio | Manutenzione).
2 Per le modalità ad output elevato: selezionare **Yes** per lavare le posizioni dei reagenti paired-end quando la corsa di sequenziamento includeva una lettura di indicizzazione o paired-end. Altrimenti, selezionare **No** (No). Selezionare **Next** (Avanti) per procedere.
3 Se si utilizza una soluzione di lavaggio fresca, preparare i componenti di lavaggio nel modo seguente:
   a Riempire otto flaconi SBS con 250 ml di soluzione di lavaggio.
   b Riempire dieci provette paired-end con 12 ml di soluzione di lavaggio.
   c Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): riempire le provette Eppendorf con 1,6 ml di soluzione di lavaggio e caricarle nella stazione di caricamento.

Se viene utilizzata la soluzione di lavaggio, rabboccare i flaconi e le provette salvati dal lavaggio precedente.

4. Per una soluzione di lavaggio fresca, assegnare ciascun flacone e provetta a una posizione sul rack reagenti e mantenere queste posizioni per ciascun lavaggio successivo. Altrimenti, la soluzione di lavaggio potrebbe contaminarsi con i reagenti presenti nei pescanti.
5. Caricare i flaconi e le provette sullo strumento nella posizione del rack reagenti appropriata.
6. Selezionare la casella di controllo **Wash solution loaded and template loading station closed** (Soluzione di lavaggio caricata e stazione di caricamento del templato chiusa).
7. Selezionare **Next** (Avanti).
8. Rimuovere la cella a flusso dal piano portacelle e metterla da parte fino a quando si è pronti a caricare nuovamente la stessa cella a flusso prima di avviare il lavaggio.
9. Indossare un paio di guanti nuovi, premere leggermente su un lato della guarnizione anteriore fino a quando l'altro lato si solleva. Utilizzare delle pinzette per afferrare e rimuovere la guarnizione. Ripetere per rimuovere la guarnizione posteriore.

Figura 49 Rimozione delle guarnizioni dei collettori usate

10. Collocare una nuova guarnizione a 10 porte nella parte anteriore del collettore e una nuova guarnizione a 8 porte nella parte posteriore del collettore.
11. Riposizionare la cella a flusso.
12. Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata Load Wash Flow Cell (Caricamento della cella a flusso per il lavaggio).

13 Selezionare **Next** (Avanti).

14 Eseguire una verifica della fluidica:
   a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina. Accettare i valori predefiniti della pompa.
   b Selezionare **Pump** (Pompa).
   c Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori. Un eccesso di bolle è normale per la soluzione di lavaggio Tween 20 e ProClin 300 e non incide sul volume erogato.

15 Rimuovere gli otto tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore per gli scarti. Non includere gli otto tubi per la cella a flusso opposta, o i tubi dalla pompa di scarico condensa.

16 Per le modalità ad output elevato: fissare insieme gli otto tubi con parafilm, assicurandosi di tenere tutti i tubi allo stesso livello. Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.

17 Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): posizionare le estremità dei tubi 4 e 5 in un contenitore vuoto. Posizionare le estremità di tutti gli altri tubi in un flacone di acqua pulita per impedire che entri aria nelle pompe delle siringhe.

18 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio.

19 Al termine della corsa, selezionare **Return to Start** (Torna all'avvio).

20 Misurare il volume erogato.

NOTA
Tutti i flaconi e le provette sono riempite del tutto per assicurarsi che i pescanti siano sciacquati. Tuttavia, il volume erogato per ciascuna posizione varia così i flaconi e le provette contengono volumi diversi al termine del lavaggio.

Posizioni	Volume erogato per la cella a flusso High Output (Output elevato)	Volume erogato per la cella a flusso Rapid (Rapida)
Otto posizioni SBS	82 ml	29 ml
Dieci posizioni paried-end	76 ml	30 ml
Una posizione libreria	Vuoto	1,2 ml
Tutte le posizioni	19,75 ml per corsia	30,1 ml per corsia

21 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel contenitore per gli scarti.

Esecuzione di un lavaggio con acqua

Questo lavaggio con acqua è richiesto dopo ciascuna corsa di sequenziamento. Dopo una corsa ad output elevato, è possibile eseguire un lavaggio di manutenzione al posto di un lavaggio con acqua.

Se lo strumento è rimasto inattivo per uno o più giorni, eseguire un lavaggio con acqua prima di avviare una nuova corsa di sequenziamento.

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Acqua da laboratorio

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Otto flaconi da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Dieci provette da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Acqua da laboratorio
- Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): una provetta Eppendorf con tappo flip-top per ciascuna cella a flusso

Procedura

1. Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Water** (Lavaggio | Acqua).
2. Selezionare **Yes** (Sì) se si sta eseguendo il lavaggio delle posizioni di reagenti PE. In caso contrario, selezionare **No** (No) per lavare solo le posizioni dei reagenti SBS. Selezionare **Next** (Avanti) per procedere.
3. Caricare lo strumento con acqua da laboratorio come segue:
   a. Riempire otto flaconi con 20 ml di acqua da laboratorio.
   b. Riempire dieci provette PE con 10 ml di acqua da laboratorio.
   c. Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): riempire la provetta Eppendorf con 1 ml di acqua da laboratorio.
4. Accertarsi che sia caricata una cella a flusso usata. Se necessario, caricare una cella a flusso usata. Selezionare **Next** (Avanti).
5. Eseguire una verifica della fluidica:

a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina. Accettare i valori predefiniti della pompa.
   b Selezionare **Pump** (Pompa).
   c Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.

6 Rimuovere i tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore per gli scarti. Non includere i tubi per la cella a flusso opposta, o i tubi dalla pompa di scarico condensa.

7 Per le modalità ad output elevato: fissare insieme i tubi con parafilm, assicurandosi di tenere tutti i tubi allo stesso livello. Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.

8 Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): posizionare le estremità dei tubi 4 e 5 in un contenitore vuoto. Posizionare le estremità di tutti gli altri tubi in un flacone di acqua pulita per impedire che entri aria nelle pompe delle siringhe.

9 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con NaOH.

Posizioni	Tempo di esecuzione approssimativo
Otto posizioni SBS	20 minuti
Otto posizioni SBS e dieci posizioni paired-end	60 minuti
Modalità Rapid Run (Corsa rapida): otto posizioni SBS, dieci posizioni paired-end e una posizione di caricamento della libreria	10 minuti

10 Al termine del lavaggio, misurare il volume di erogazione e registrarlo sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	32 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni paired-end	72 ml
Modalità Rapid Run (Corsa rapida): otto posizioni SBS, dieci posizioni paired-end e una posizione di caricamento della libreria	9,5 ml per corsia

11 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel flacone degli scarti.

Cambio della modalità di sequenziamento

Usare il comando **Mode Select** (Selezione modalità) dalla schermata Welcome (Benvenuto) per passare tra le modalità ad output elevato e la modalità Rapid Run (Corsa rapida).

Solo le corse della stessa modalità possono essere eseguite simultaneamente. Quindi, i cambi di modalità si applicano sia alla cella a flusso A che alla cella a flusso B. Se entrambe le celle sono in elaborazione, non è possibile un cambio di modalità.

Quando si cambia modalità, è richiesto un lavaggio di manutenzione e un cambio delle guarnizioni. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 118.

Passaggio dalla modalità High Output (Output elevato) alla modalità Rapid Run (Corsa rapida)

Il passaggio da una modalità High Output (Output elevato) - HiSeq v4 o TruSeq v3 - a una modalità Rapid Run (Corsa rapida) richiede una lavaggio di manutenzione per la modalità rapida.

Specifica	Lavaggio di manutenzione rapido
Tipo di cella a flusso	Cella a flusso rapida (due corsie)
Guarnizione cella a flusso	Guarnizione a 10 porte o a 8 porte
Reagenti	Tween 20 e ProClin 300
Volumi previsti (ml)	60,2 ml
Tempo (minuti)	60 minuti

Passaggio dalla modalità Rapid Run (Corsa rapida) alla modalità High Output (Output elevato)

Il passaggio dalla modalità Rapid Run (Corsa rapida) a una modalità High Output (Output elevato) - HiSeq v4 o TruSeq v3 - richiede un lavaggio di manutenzione per la modalità a corsa rapida seguito da un lavaggio di manutenzione per la modalità ad output elevato.

Specifica	Lavaggio di manutenzione rapido	Lavaggio di manutenzione ad output elevato
Tipo di cella a flusso	Cella a flusso rapida (due corsie)	Cella a flusso ad output elevato (otto corsie)
Guarnizione cella a flusso	Guarnizione a 10 porte o a 8 porte	Guarnizione a 10 porte o a 8 porte
Volumi previsti (ml)	60,2 ml	158 ml
Tempo (minuti)	60 minuti	130 minuti
Tempo totale per cambio di modalità	circa 3 ore	

Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)

Usare le istruzioni seguenti per preparare lo strumento e porlo nello stato inattivo fino a 10 giorni. Per durate più lunghe di 10 giorni, vedere *Spegnimento dello strumento* a pagina 127.

1 Eseguire un lavaggio di manutenzione completo, per lavare completamente il sistema. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 118.

2 Lasciare la cella a flusso sul piano portacelle con la leva della cella in posizione 2. I collettori rimangono nella posizione sollevata.

3 Per le modalità ad output elevato: caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei reagenti nei rack reagenti. Quindi abbassare i pescanti.

4 Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei reagenti e 1 ml di acqua da laboratorio nella posizione della stazione di caricamento dei campioni nei rack reagenti. Quindi abbassare i pescanti.

5 Non spegnere lo strumento.

6 Prima di utilizzare di nuovo lo strumento, eseguire un lavaggio con acqua. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.

Spegnimento dello strumento

Spegnere lo strumento solo se non si prevede di utilizzarlo entro i successivi 10 giorni o più. Se si prevede di utilizzare lo strumento entro i successivi 10 giorni, vedere *Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)* a pagina 126.

Attenersi alla procedura seguente per porre la fluidica in uno stato di sicurezza e per spegnere il sistema.

1 Eseguire un lavaggio di manutenzione per pulire il sistema. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 118.

2 Rimuovere la cella a flusso dal piano portacelle.

3 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella fino a quando non è pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

4 Per le modalità ad output elevato: caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei reagenti nei rack reagenti. Quindi abbassare i pescanti.

5 Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei reagenti e 1 ml di acqua da laboratorio nella posizione della stazione di caricamento dei campioni nei rack reagenti. Quindi abbassare i pescanti.

6 Spegnere lo strumento.

7 Per riavviare lo strumento, caricare l'acqua in tutte le posizioni dei reagenti, accendere lo strumento ed eseguire un lavaggio con acqua. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.

Software Real-Time Analysis (RTA)

Capitolo 6

Introduzione

Durante una corsa di sequenziamento su HiSeq 2500, il software Real-Time Analysis esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi integrate sullo strumento, il che permette di risparmiare tempo prezioso durante la successiva analisi dei dati.

Panoramica sul software Real-Time Analysis

Real-Time Analysis viene eseguito sul computer dello strumento, esegue l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna identificazione delle basi.

Il software monitora lo stato di ciascuna tile e determina quando passarla alla fase successiva del processo. Quando una tile passa alla fase successiva, il software Real-Time Analysis crea un file per la fase completata e avvia la fase successiva. Così il software può determinare lo stato di ciascuna tile in base a quale file è stato creato. Se il software Real-Time Analysis è stato terminato, i dati della corsa vengono salvati ed è possibile riprendere l'elaborazione.

Input per il software Real-Time Analysis

Real-Time Analysis richiede i file di input seguenti:

- I file delle intensità dei cluster, che contengono i risultati dell'analisi delle immagini.
- RunInfo.xml, che il software di controllo genera automaticamente all'inizio della corsa. Da questo file, Real-Time Analysis legge il nome della corsa, il numero di cicli, se una lettura è indicizzata e il numero di tile sulla cella a flusso.
- HiSeq.Configuration.xml, che è un file di configurazione dello strumento in formato XML.
- RTA.exe.config, che è un file di configurazione software in formato XML.

Real-Time Analysis utilizza i parametri della corsa immessi durante l'impostazione della corsa e riceve i comandi dal software di controllo che comprendono le informazioni su quando avviare la corsa e sulla posizione di RunInfo.xml.

Output del software Real-Time Analysis

Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come un campo visivo della videocamera. Per ciascuna tile analizzata, il software Real-Time Analysis crea un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e file filtro come output primari. Altri file supportano la generazione di file di output primari.

- **File di identificazione delle basi**: per ciascuna tile analizzata, viene generato un file compresso di identificazione delle basi (*.bcl) per ciascuna tile per ciclo. Questo file contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato.

- **File filtro**: ciascuna tile produce informazioni sul filtro che sono incluse in un file filtro (*.filter) per ciascuna tile per l'intera corsa. Questo file specifica se un cluster ha attraversato i filtri.
- **File posizione cluster**: un file posizione cluster (*.locs) contiene le coordinate X,Y per ciascun cluster sulla cella a flusso.
- **File statistiche**: per ciascun ciclo, viene creato un file statistiche (*.stats). Il file statistiche contiene statistiche aggregate per il ciclo.

I file di output primari sono usati per l'analisi dei dati successiva. Utilizzare bcl2fastq per eseguire il de-multiplexing e la conversione dei file .bcl in file FASTQ, che possono essere utilizzati come input per l'allineamento. Per convertire i dati da HiSeq, utilizzare bcl2fastq 1.8.4, o versione successiva.

Real-Time Analysis fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono file binari che contengono tile, ciclo e metriche a livello di lettura e sono richiesti per visualizzare le metriche nel software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Per visualizzare le metriche generate dal software Real-Time Analysis, utilizzare il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) v1.8.20, o versione successiva.

Per maggiori informazioni, vedere *File di output del sequenziamento* a pagina 141.

Gestione degli errori del software Real-Time Analysis

Il software Real-Time Analysis tiene i file di registro nella cartella RTALogs. Se si verifica un errore, questo viene registrato in un file di registro errori denominato *Error.txt.

NOTA
Il software crea il file di registro errori solo se si verifica un errore.

Trasferimento dei dati

Durante la corsa, il software Real-Time Analysis copia automaticamente i dati generati dai file immagine non elaborati nella cartella di output specificata. Se l'analisi delle immagini accumula ritardo, il software Real-Time Analysis arresta l'elaborazione e pone la cella a flusso in uno stato sicuro. L'elaborazione riprende quando sono disponibili i dati delle immagini.

NOTA
Se per qualsiasi motivo il software Real-Time Analysis smette di funzionare, l'elaborazione riprende automaticamente durante il ciclo successivo nel punto appropriato sulla cella a flusso. Non riavviare il software Real-Time Analysis manualmente.

Se si utilizza BaseSpace, Illumina raccomanda una connettività di rete minima di non meno di 10 Mbps. Per maggiori informazioni, vedere *Guida alla preparazione della sede di installazione per HiSeq 2500, 1500 e 2000 (n. codice 15006407)*.

Il trasferimento dei dati è completo quando viene generato un file dei marker denominato Basecalling_Netcopy_complete.txt. Uno di questi file viene generato per ciascuna lettura e un file viene generato per l'intera corsa.

Monitoraggio delle metriche della corsa

Il software Real-Time Analysis genera automaticamente metriche di qualità quando inizia l'analisi delle immagini. Tuttavia, non tutte le metriche sono disponibili durante i primi cicli, poiché per generare i dati alcuni processi richiedono cicli multipli.

Dati	Ciclo
Analisi delle immagini	Dopo il ciclo 5. Durante i primi 5 cicli della corsa, il software genera una griglia con le posizioni dei cluster.
Identificazioni delle basi	Dopo il ciclo 12. L'identificazione delle basi inizia dopo che la matrice colore viene stimata al ciclo 12.
Stima della determinazione delle fasi (phasing)	Dopo il ciclo 25. La correzione della determinazione delle fasi (phasing) per i primi 25 cicli determina la stima della determinazione delle fasi (phasing).
Punteggi qualitativi	Dopo il ciclo 25. Un punteggio qualitativo viene generato per le letture che attraversano il filtro qualitativo. Poiché i punteggi qualitativi richiedono intensità corrette dai cicli successivi, il punteggio qualitativo segue sempre l'identificazione delle basi.
Percentuali di errore	Dopo il ciclo 25. Le percentuali di errore vengono generate solo quando sono presenti cluster del campione di controllo PhiX e l'opzione **Align to PhiX** (Allineamento con PhiX) viene selezionata durante l'impostazione della corsa.
Controlli in linea	Al ciclo 52 di ciascuna lettura, o al termine della corsa per le corse con meno di 52 cicli. I controlli in linea sono generati solo per i metodi di preparazione della libreria TruSeq.*
Conteggio indici	Dopo il completamento delle letture indici. Il conteggio indici per corsia viene generato solo quando è fornito un foglio campioni.

* Il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) v1.8.44 e versione successiva non comprende più la scheda TruSeq Controls (Controlli TruSeq), dove SAV riporta i risultati dell'analisi dei controlli in linea.

Sequencing Analysis Viewer (SAV)

Il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) mostra le metriche generate durante la corsa di sequenziamento. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici, diagrammi e tabelle. Il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) si apre automaticamente quando sono disponibili le metriche della corsa.

Selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualsiasi momento durante la corsa per visualizzare le metriche aggiornate.

Per ulteriori informazioni, vedere *Guida per l'utente del software Sequencing Analysis Viewer (n. codice 15020619)*.

Flusso di lavoro Real-Time Analysis

Il software Real-Time Analysis e il software di controllo eseguono il flusso di lavoro Real-Time Analysis. Il flusso di lavoro comprende le fasi seguenti:

- **Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster**: mappa le posizioni dei cluster.
- **Registrazione ed estrazione dell'intensità**: registra la posizione di ciascuna immagine sulla cella a flusso e determina un valore di intensità per ciascun cluster.
- **Correzione della matrice colore**: corregge la visualizzazione contemporanea tra i canali.
- **Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing)**: corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing).
- **Identificazione delle basi**: determina una identificazione delle basi per ogni cluster.
- **Punteggio qualitativo**: assegna un punteggio qualitativo per ogni identificazione delle basi.

Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

Il primo passaggio del flusso di lavoro è la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, che definisce la posizione di ciascun cluster in una tile usando le coordinate X e Y. La griglia viene usata come riferimento per i passaggi successivi di registrazione ed estrazione dell'intensità.

A causa dell'array casuale dei cluster sulla cella a flusso, la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster richiede i dati dell'immagine dai primi cinque cicli della corsa. Dopo che l'ultimo ciclo della griglia per una tile è stato sottoposto a imaging, viene generata la griglia.

Le posizioni cluster sono scritte su un file di posizioni cluster (*.locs) e un file di posizioni cluster (*.clocs) compresso per ciascuna tile. Per maggiori informazioni, vedere *File di output del sequenziamento* a pagina 141.

Registrazione ed estrazione dell'intensità

La registrazione e l'estrazione dell'intensità iniziano dopo la generazione della griglia delle posizioni dei cluster.

- La registrazione allinea le immagini prodotte su ogni ciclo successivo alla generazione della griglia rispetto alla griglia.
- L'estrazione dell'intensità determina un valore di intensità per ciascun cluster nella griglia per una data immagine.

Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene generata alcuna identificazione delle basi per quella tile in quel ciclo. Usare il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) per esaminare le immagini in miniatura e identificare le immagine la cui registrazione non è riuscita. Usare i file offset per risolvere i problemi relativi alla registrazione. Per maggiori informazioni, vedere *File di output del sequenziamento* a pagina 141.

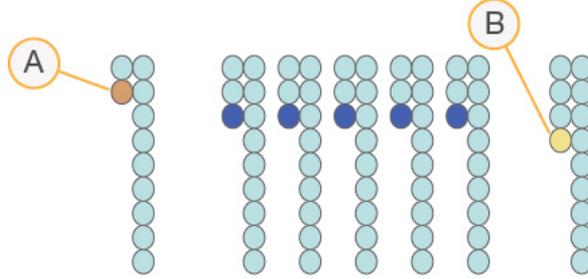
Correzione della matrice colore

Dopo la registrazione e l'estrazione dell'intensità, il software Real-Time Analysis corregge la visualizzazione contemporanea tra i canali. La visualizzazione contemporanea si verifica quando, ad esempio, un cluster mostra qualche intensità nel canale C e qualche intensità anche nel canale A. Usando una matrice colore 4 x 4, il software Real-Time Analysis genera intensità corrette in base alla matrice con ridotta o nessuna visualizzazione contemporanea e bilancia le differenze nell'intensità complessiva tra i canali colore.

Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing)

Durante la reazione di sequenziamento, ciascun filamento di DNA in un cluster si estende di una base per ciclo. La determinazione delle fasi (phasing) e la predeterminazione delle fasi (prephasing) si verificano quando un filamento fuoriesce dalla fase con il ciclo di incorporazione attuale.

- La determinazione delle fasi (phasing) si verifica quando una base rimane indietro.
- La predeterminazione delle fasi (prephasing) si verifica quando una base salta in avanti.

Figura 50 Determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing)

A Lettura con una base nella determinazione delle fasi (phasing)
B Lettura con una base nella predeterminazione delle fasi (prephasing)

Real-Time Analysis corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) usando un algoritmo empirico per la correzione della determinazione delle fasi (phasing), che massimizza la qualità dei dati a ciascun ciclo per tutta la corsa.

I risultati della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) sono registrati nel file denominato EmpiricalPhasing_[corsia]_[lettura]_[tile].txt, che si trova nella cartella Data\Intensities\BaseCalls\Phasing.

Identificazione delle basi

Dopo che le intensità non elaborate sono state corrette in base al colore e corrette in base al calcolo della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing), il canale colore con l'intensità più luminosa rappresenta l'identificazione delle basi per quel cluster in quel ciclo. L'identificazione delle basi su HiSeq 2500 utilizzando il software Real-Time Analysis inizia dopo il ciclo 12.

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ciascun cluster di una data tile a un ciclo specifico. Le identificazioni delle basi sono salvate nei file di identificazione delle basi (*.bcl), che sono file binari con 1 byte per identificazione e punteggio qualitativo. Ciascuno di questi file contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato. Per eseguire una identificazione delle basi, i cluster devono prima attraversare il filtro Chastity. I cluster che non attraversano il filtro o che non possono essere identificati perché fuori dall'immagine o perché non si è verificata la registrazione dell'immagine sono etichettati come senza identificazione. I cluster 'senza identificazione' sono rappresentati da (N).

Cluster che attraversano il filtro

Durante il primi 25 cicli di Lettura 1, il filtro Chastity rimuove i cluster meno affidabili dai risultati dell'analisi. I cluster attraversano il filtro se non più di due identificazioni delle basi presentano un valore Chastity inferiore a 0,6 durante i primi 25 cicli. Il valore Chastity rappresenta il rapporto dell'intensità più luminosa delle basi divisa per la somma dell'intensità più luminosa delle basi e l'intensità più luminosa della seconda base. La percentuale di cluster che attraversano il filtro è rappresentata nei report dell'analisi come %PF.

I cluster si generano in un array casuale e sono individuati durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. I cluster di bassa qualità sono rimossi dal conteggio dei cluster non elaborati durante la generazione della griglia, questo porta a una percentuale relativamente elevata di cluster che attraversano il filtro.

Punteggio qualitativo

Un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione della probabilità di un'identificazione delle basi errata. Un punteggio qualitativo superiore implica che un'identificazione delle basi è più affidabile e più probabile che sia corretta.

Il punteggio qualitativo permette di comunicare velocemente la probabilità di piccoli errori. I punteggi qualitativi sono rappresentati come Q(X), dove X è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra il punteggio qualitativo e la probabilità di errore.

Punteggio qualitativo Q(X)	Probabilità di errore
Q40	0,0001 (1 su 10.000)
Q30	0,001 (1 su 1.000)
Q20	0,01 (1 su 100)
Q10	0,1 (1 su 10)

NOTA
Il punteggio qualitativo si basa su una versione modificata dell'algoritmo Phred. Per maggiori informazioni, vedere en.wikipedia.org/wiki/Phred_quality_score.

Il punteggio qualitativo calcola un set valori per ciascuna identificazione delle basi e quindi usa questi valori per individuare il punteggio qualitativo in una tabella qualitativa. Le tabelle qualitative sono create per fornire previsioni di qualità accurate e ottimali per le corse generate da una specifica configurazione di una piattaforma di sequenziamento e versione della chimica.

Dopo la determinazione del punteggio qualitativo, i risultati sono registrati nei file per l'identificazione delle basi (*.bcl). Per maggiori informazioni, vedere *File di output del sequenziamento* a pagina 141.

Raggruppamento dei punteggi qualitativi

Il software Real-Time Analysis raggruppa i punteggi qualitativi in base a intervalli, o raggruppamenti, specifici ed assegna un valore a ciascun intervallo. Il raggruppamento dei punteggi qualitativi riduce significativamente i requisiti di spazio di archiviazione senza incidere sull'accuratezza e sulle prestazioni delle applicazioni a valle.

Il raggruppamento dei punteggi qualitativi contribuisce all'efficienza dei processi dell'analisi e ai requisiti di trasferimento dei dati associati con l'elevata produttività di HiSeq 2500. Il file *.bcl ottenuto è più piccolo perché gli algoritmi di compressione sono in grado di comprimere i file in modo più efficiente. La copia dei file è più veloce grazie alla minor quantità di dati archiviati sul computer dello strumento e trasferiti a una posizione di rete.

File di output del sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi che contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati nelle cartelle per il ciclo per ciascuna corsia. s_[Corsia]_[Tile].bcl.gz, dove la corsia è il numero a una sola cifra della corsia e la tile è il numero a quattro cifre della tile. I file di identificazione delle basi sono compressi usando gzip.
File posizione cluster	Per ciascuna tile, un file posizione cluster contiene le coordinate XY per ciascun cluster. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. Data\Intensities
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. I file filtro sono generati al ciclo 26 usando 25 cicli di dati. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e tile. s_[corsia]_[tile].filter
File InterOp	File report binari usati per il software Sequencing Analysis Viewer (SAV). I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
File di registro	Registrano gli eventi e sono aggiornati per tutta la durata della corsa. Data\RTALogs
File offset	Per ciascuna corsa sono creati due file offset: • offsets.txt: contiene gli offset delle tile per ciascun ciclo e canale relativo alla griglia. • SubTileOffsets.txt: contiene lo spostamento misurato per ciascun quadrante di ciascuna immagine relativo all'inquadratura di riferimento. Data\Intensities\Offsets

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File determinazione delle fasi (phasing)	Contiene informazioni empiriche per la determinazione delle fasi (phasing) per tile. I file determinazione delle fasi (phasing) sono creati alla prima identificazione delle basi del ciclo e aggiornati dopo ogni identificazione delle basi del ciclo. Data\Intensities\BaseCalls\Phasing EmpiricalPhasing_[corsia]_[lettura]_[tile].txt: la tile è rappresentata da un numero a quattro cifre che indica superficie, striscia e tile.
File di configurazione del software Real-Time Analysis	Creati all'inizio della corsa, i file di configurazione del software Real-Time Analysis elencano le impostazioni per la corsa. Data\Intensities RTAConfiguration.xml
File statistiche	Le statistiche create all'identificazione delle basi per ciascun ciclo. Data\Intensities\Basecalls\L00[X]\C[X.1]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sottocartella per ciascuna tile.
File informazioni corsa	Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è una lettura indicizzata e il numero di strisce e tile sulla cella a flusso. Il file informazioni corsa viene creato all'inizio della corsa. [Cartella della corsa, livello base] RunInfo.xml
File di immagini in miniatura (thumbnail)	Un'immagine in miniatura per ciascun canale e tile in ciascuna striscia a ogni ciclo durante l'imaging. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sotto cartella per ciascun ciclo. s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg: la tile è rappresentata da un numero a quattro cifre che indica superficie, striscia e tile. Vedere *Numerazione delle tile* a pagina 145.

Struttura della cartella di output

Config: le impostazioni di configurazione per la corsa.
Dati
Intensities
BaseCalls
L00[X]: i file di identificazione delle basi per ciascuna corsia, aggregate in un file per ciclo.
Phasing: i file per la determinazione delle fasi (phasing) empirica, un file per tile a ciascun ciclo.
L00[X]: i file di posizioni cluster aggregate per ciascuna corsia.
Offsets: due file di offset per la corsa.
RTAConfiguration.xml

Images
Focus
L00[X]: le immagini di messa a fuoco per ciascuna corsia.

InterOp: i file binari utilizzati dal Sequencing Analysis Viewer (SAV).
Logs: i file di registro che descrivono gli eventi operativi.
Recipe: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti.
RTALogs: i file di registro che descrivono gli eventi del software Real Time Analysis (RTA).
Thumbnail_Images: le immagini in miniatura di 9 posizioni da ciascuna tile, generate per ciascun ciclo e base.
RunInfo.xml
RunParameters.xml

Nome e percorso della cartella della corsa

La cartella della corsa è la cartella al livello base per gli output generati da una corsa di sequenziamento. Durante l'impostazione della corsa, il software chiede all'utente di inserire il percorso della cartella della corsa. Per impostazione predefinita, alla cartella viene assegnato un nome nel seguente formato:

AAMMGG_<Nome computer>_<Numero corsa>_<ID cella a flusso>
Esempio: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

Il numero della corsa viene incrementato di uno ogni volta che si esegue una corsa sullo strumento. L'ID della cella a flusso inserito durante le fasi d'impostazione della corsa viene aggiunto alla fine del nome della cartella della corsa.

La cartella della corsa è scritta secondo il percorso di output specificato nella schermata Scan (Scansione) durante l'impostazione della corsa. La cartella temporanea della corsa per la cella a flusso A è scritta nell'unità D: e la cartella temporanea della corsa per la cella a flusso B è scritta nell'unità E:.

Numerazione delle tile

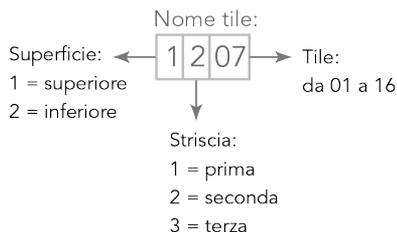
La cella a flusso ad output elevato HiSeq viene sottoposta a imaging in 96 tile su ciascuna corsia, nella parte superiore e nella parte inferiore, per ciascun ciclo. Ciascuna corsia dispone di tre strisce con 16 tile per striscia. La cella a flusso per corsa rapida viene sottoposta a imaging in 64 tile. Ciascuna corsia dispone di due strisce con 16 tile per striscia.

Il nome della tile è un numero di quattro cifre che rappresenta la posizione sulla cella a flusso.

- La prima cifra rappresenta la superficie:
  - 1 è per la superficie superiore
  - 2 è per la superficie inferiore
- La seconda cifra rappresenta la striscia:
  - 1 è per la prima striscia
  - 2 è per la seconda striscia
  - 3 è per la terza striscia (se applicabile)

NOTA
Una striscia è una colonna di tile all'interno di una corsia di una cella a flusso.

- Le ultime due cifre rappresentano la tile, da 01 a 16. La numerazione delle tile parte da 01 sul lato di output della cella a flusso fino a 16 sul lato di input.

Figura 51 Numerazione delle tile

L'esempio indica una tile sulla superficie superiore della cella a flusso, nella seconda striscia, settima tile.

Immagini in miniatura (thumbnail)

Il software di controllo può essere configurato per generare immagini in miniatura (thumbnail) in formato file *.jpg. Si generano immagini in miniatura per ciascun ciclo e base.

Il software di controllo raccoglie le immagini da 9 sezioni di una tile. Le nove immagini sono combinate in un'unica immagine in miniatura e questa può essere utilizzata per la risoluzione di eventuali problemi di una corsa. Le immagini in miniatura non sono adatte per l'analisi delle immagini, ma possono essere utilizzate per la risoluzione dei problemi.

Figura 52 Immagine in miniatura (thumbnail)

Risoluzione dei problemi

Capitolo 7

Introduzione

Questa sezione descrive le possibili soluzioni in caso di problemi durante una corsa di sequenziamento e come eseguire una verifica della fluidica dalla schermata Welcome (Benvenuto).

Possibili problemi d'impostazione della corsa

Problema	Possibile causa	Intervento
Il software non ha eseguito l'inizializzazione.	Il software non è stato in grado di inizializzare i dispositivi hardware interni.	Chiudere il messaggio d'errore e poi lanciare nuovamente il software dello strumento. Se il problema persiste, riavviare il computer dello strumento. Se si riavvia il computer, prima spegnere lo strumento per assicurarsi che il drive DoNotEject sia riconosciuto correttamente. Se il problema persiste dopo il riavvio del computer dello strumento, spegnere lo strumento, attendere almeno 60 secondi e poi riavviare lo strumento.
La leva della cella a flusso è arancione.	La cella a flusso non è collocata correttamente. Si è persa la chiusura a vuoto. I collettori non si sono sollevati.	Rimuovere la cella a flusso e ripetere le fasi di pulizia. Verificare che le guarnizioni siano presenti e posizionate correttamente. Riposizionare la cella a flusso. Se la procedura descritta non risolve il problema, cercare di sostituire le guarnizione e quindi caricare nuovamente la cella a flusso.
La leva della cella a flusso lampeggia arancione.	Il vuoto è fornito ma non è adeguato.	Rimuovere la cella a flusso e ripetere le fasi di pulizia. Verificare che le guarnizioni siano presenti e posizionate correttamente. Riposizionare la cella a flusso. Se la procedura descritta non risolve il problema, cercare di sostituire le guarnizione e quindi caricare nuovamente la cella a flusso.
La leva della cella a flusso lampeggia verde.	La pressione del vuoto è buona.	Portare la leva della cella a flusso in posizione 2.

Problema	Possibile causa	Intervento
Erogazione fluido scadente.	Bolle potenziali nel sistema.	Riposizionare la cella a flusso e confermare che i fori siano rivolti verso il ***basso***. Osservare se è presente del precipitato bianco attorno alle guarnizioni. Se è presente del precipitato, sostituire le guarnizioni. Prima del lavaggio di manutenzione dello strumento sostituire sempre le guarnizioni. Confermare che i gruppi dei pescanti siano completamente abbassati e che ciascun pescante sia a contatto con i reagenti.

Corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B

1. Attendere che la corsa sulla cella a flusso adiacente abbia avviato una fase della chimica e quindi selezionare **Pause** (Pausa). Si apre il menu Pause (Pausa).

NOTA
Mettere sempre in pausa la corsa corrente durante una fase della chimica piuttosto che durante una fase di imaging.

2. Selezionare **Normal Pause** (Pausa normale).
3. Attendere che il software completi la fase della chimica attuale. Il sistema viene messo automaticamente in uno stato sicuro.
4. Dopo aver messo in pausa la corsa adiacente, impostare la nuova corsa.
5. Dopo aver caricato la nuova cella flusso per la nuova corsa, chiudere lo sportello dello scomparto.
6. Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la nuova corsa di sequenziamento.
7. Selezionare **Resume** (Riprendi) sulla cella a flusso adiacente per riprendere la corsa messa in pausa. Il software controlla automaticamente i processi della chimica e di imaging su entrambe le celle a flusso.

Esecuzione di una verifica della fluidica

Il pulsante Check (Verifica) sulla schermata Welcome (Benvenuto) esegue la verifica della fluidica. Utilizzare questa opzione durante l'installazione dello strumento e quando si risolvono problemi alla fluidica.

1. Caricare sullo strumento una cella a flusso usata.
2. Caricare otto flaconi SBS con PW1 o con acqua da laboratorio e caricare i flaconi sul corrispondente rack reagenti. Caricare il rack sullo strumento.
3. Selezionare **Check** (Verifica) sulla schermata Welcome (Benvenuto).
4. Selezionare la soluzione 5 (SB2) dall'elenco a tendina. Se si sta eseguendo una verifica della fluidica con una cella a flusso usata, selezionare la soluzione 2, che è acqua.
5. Inserire i valori predefiniti seguenti:
   - Volume (Volume): **250**
   - Per le modalità HiSeq v4 e TruSeq v3: Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
   - Per la modalità Rapid Run (Corsa rapida): Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **1500**
   - Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
6. Selezionare **Pump** (Pompa). Per mettere in pausa la verifica della fluidica, selezionare **Pause** (Pausa).
7. Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
   Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni del collettore, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl di acqua nella cella a flusso.

BaseSpace non è disponibile

Se BaseSpace non è disponibile, aprire Servizi di Windows per assicurarsi che BaseSpace Broker sia avviato. In caso contrario, riavviarlo. Se i servizi sono in esecuzione e BaseSpace non è ancora disponibile, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Arresto e ripresa di una corsa

Potrebbe essere necessario arrestare una corsa in caso di errata impostazione, se la qualità dei dati è insoddisfacente o se si verifica un errore hardware. Per riprendere una corsa arrestata, assicurarsi di aver selezionare le opzioni di arresto normale che permettono la corsa da riprendere.

Opzione di arresto	Opzione Real-Time Analysis	In grado di riprendere?
Normal Stop (End of Lane\Chemistry) [Arresto normale (fine corsia/chimica)]	Keep As Is (Mantenere come si trova)	Sì. La corsa riprende al prossimo comando della chimica o di imaging.
	Complete For Run (Completare per corsa)	No. Non è possibile riprendere la corsa.
	Complete For Read (Completare per lettura)	Sì. La corsa riprende all'inizio della lettura successiva.
Normal Stop (End of Cycle) [Arresto normale (fine del ciclo)]	Keep As Is (Mantenere come si trova)	Sì. La corsa riprende al ciclo successivo.
	Complete For Run (Completare per corsa)	No. Non è possibile riprendere la corsa.
	Complete For Read (Completare per lettura)	Sì. La corsa riprende all'inizio della lettura successiva.
Immediate Stop (Arresto immediato)	No option (Nessuna opzione)	No.

1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Stop** (Arresto). Si apre il menu Stop (Arresto).

Figura 53 Arresto della corsa

2 Selezionare una delle seguenti opzioni di arresto:

3 Selezionare una opzione di arresto:

- **Normal Stop (End of Lane\Chemistry)** [Arresto normale (fine corsia/chimica)]: arresta la corsa solo dopo il completamento del comando corrente per la chimica o per l'imaging e poi pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- **Normal Stop (End of Cycle)** [Arresto normale (fine del ciclo)]: arresta la corsa dopo il completamento del ciclo corrente e poi pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- **Immediate Stop** (Arresto immediato): arresta la corsa senza completare l'operazione corrente e ***non*** pone la cella a flusso in uno stato sicuro. Non è possibile riprendere una corsa arrestata usando il comando Immediate Stop (Arresto immediato).

4 Selezionare dalle opzioni Real-Time Analysis seguenti:
   - **Keep As Is** (Mantenere come si trova): la corsa è arrestata senza alcun cambiamento su Real-Time Analysis. La corsa può riprendere se era stata arrestata.
   - **Complete For Run** (Completare per corsa): si arresta il software Real-Time Analysis. Le informazioni sulla corsa, i parametri della corsa e i file ricetta vengono aggiornati in modo da far corrispondere i cicli totali secondo l'ultimo ciclo completato. Poi il software Real-Time Analysis riprende per completare l'identificazione della basi per la corsa fino al punto in cui la corsa era stata arrestata. Non è possibile riprendere la corsa.
   - **Complete For Read** (Completare per lettura): si arresta il software Real-Time Analysis. Le informazioni sulla corsa, i parametri della corsa e i file ricetta vengono aggiornati in modo da regolare e ridurre (trim) la lunghezza della lettura corrente secondo l'ultimo ciclo completato. Le letture seguenti non ne sono influenzate. Poi il software Real-Time Analysis riprende per completare l'analisi della lettura corrente. La corsa riprende all'inizio della lettura successiva.

5 Dopo l'arresto della corsa, selezionare **Return to Start** (Ritornare all'avvio) sulla schermata Run Overview (Panoramica corsa). Si apre la schermata Welcome (Benvenuto).

Ripresa di una corsa arrestata

Si può riprendere una corsa solo quando la corsa era stata arrestata in sicurezza utilizzando un'opzione di arresto normale con un'opzioni del software Real-Time Analysis che permette di riprendere la corsa.

NOTA
Se il lato adiacente sta eseguendo la generazione di cluster o la chimica di sequenziamento paired-end, la corsa non può riprendere fino a quando il processo in corso è completato.

1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Sequence** (Sequenzia), e poi selezionare **Resume Run** (Ripresa corsa). Si apre la schermata Resume (Ripresa).

2 Selezionare la cartella della corsa appropriata dall'elenco a tendina.

NOTA
Il software riprende la corsa dal punto in cui la stessa era stata interrotta, preimpostando la corretta impostazione sulla schermata Resume (Ripresa).

3 Confermare le impostazioni sulla schermata Resume (Ripresa) o selezionare il punto appropriato della corsa per riprenderla.
- **Resume At** (Riprendi a) presenta un elenco con la lettura o il punto della corsa da cui riprendere.
- **Start At Cycle** (Inizia dal ciclo) presenta un elenco con il ciclo da cui riprendere.

ATTENZIONE
Illumina non consiglia di riprendere una corsa al punto d'inversione (turnaround) paired-end, salvo che per la re-ibridazione primer Lettura 2.

4 Confermare le impostazioni sulla schermata Resume (Ripresa) o selezionare i comandi di imaging e della chimica per la ripresa. Per maggiori informazioni, vedere *Esempio di impostazioni per la ripresa di una corsa* a pagina 156.

5 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere. Il software guida l'utente attraverso le fasi rimanenti di impostazione della corsa.

Esempio di impostazioni per la ripresa di una corsa

Se la corsa è stata arrestata dopo l'imaging della corsia 1 al ciclo 23, il software stabilisce automaticamente le impostazioni per la ripresa per Read #1 (Lettura 1) at cycle (al ciclo) 23. Il sistema mostra le impostazioni seguenti sulla schermata Resume (Ripresa):
- **Resume At (Riprendi a):** Read 1 (Lettura 1)
- **Start At Cycle (Inizia al ciclo):** 23

Figura 54 Esempio di ripresa al ciclo 23

Dato che in questo esempio la corsa era stata arrestata durante una fase di imaging, **Imaging (no chemistry)** [Imaging (nessuna chimica)] viene selezionato automaticamente.

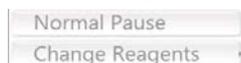
Messa in pausa di una corsa

ATTENZIONE
Non interrompere una corsa durante la fase di imaging. Utilizzare la funzione di interruzione Normal (Normale), a fine ciclo o a fine corsia, per interrompere e riprendere una corsa.

Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa) è possibile mettere in pausa una corsa. La messa in pausa di una corsa potrebbe essere necessaria per verificare i componenti della corsa, ad esempio i volumi dei reagenti, prima di procedere con la corsa. In condizioni di funzionamento normale, non è necessario mettere in pausa una corsa.

1. Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause** (Pausa). Si apre il menu Pause (Pausa).

   Figura 55 Opzioni Pausa

   Normal Pause
   Change Reagents

2. Selezionare **Normal Pause** (Pausa normale).
3. Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando pausa. Il software completa il comando corrente per la chimica o per l'imaging e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
4. Selezionare **Resume** (Riprendi) per riprendere la corsa.

Sostituzione dei reagenti durante una corsa

Se la corsa è stata avviata con un volume di reagenti solo parziale, utilizzare la funzione Change Reagents (Cambia reagenti) per mettere in pausa la corsa e riempire i reagenti.

1. Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause** (Pausa). Si apre il menu Pause (Pausa).
2. Selezionare **Change Reagents** (Cambia reagenti).
3. Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando pausa. Il software completa il comando corrente per la chimica o per l'imaging, pone la cella a flusso in uno stato sicuro e apre la schermata Reagents (Reagenti).
4. Sulla schermata Reagents (Reagenti), inserire i seguenti parametri del reagente:
   - L'ID del kit di reagenti per i nuovi reagenti.
   - Il numero di cicli per i quali si prevede che i reagenti dureranno.

NOTA
Sulla schermata Change Reagents (Cambia reagenti) la casella di spunta per il priming è disabilitata. Il priming non è necessario.

5 Selezionare **Next** (Avanti) per passare al caricamento dei reagenti.

Reibridazione primer

Una corsa di reibridazione ripete la fase di sequenziamento di ibridazione dei primer. Se le metriche della corsa indicano un numero basso di cluster, intensità basse di cluster o altri problemi, eseguire una reibridazione primer per salvare la cella a flusso. La reibridazione primer non danneggia i cluster sulla cella a flusso.

Cella a flusso HiSeq v4

Tutte le fasi di reibridazione sono eseguite su HiSeq 2500. Il kit include primer per Lettura 1, Lettura Indice 1, Lettura Indice 2 per celle a flusso unidirezionali e Lettura 2.

Nome kit per reibridazione	Istruzioni per il flusso di lavoro
HiSeq Multi-Primer Rehyb Kit v4 N. di catalogo GD-403-4001	*Guida per la reibridazione primer HiSeq (n. di catalogo 15050105)*

Cella a flusso HiSeq v3

La reibridazione primer per Lettura 1 viene eseguita su cBot. Il kit include una piastra dei reagenti cBot contenente il primer di sequenziamento HP6 per Lettura 1. Per le librerie Nextera, usare HP10 contenuto nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Nome kit per reibridazione	Istruzioni per il flusso di lavoro
TruSeq v2 cBot Multi-Primer Rehyb Kit N. di catalogo GD-304-2001	*Reibridazione primer Lettura 1 su cBot (n. codice 15018149)*

Cella a flusso Rapid

Tutte le fasi di reibridazione sono eseguite su HiSeq 2500. Il kit include primer per Lettura 1, Lettura Indice 1, Lettura Indice 2 per celle a flusso unidirezionali e Lettura 2.

Nome kit per reibridazione	Istruzioni per il flusso di lavoro
HiSeq Rapid Rehyb Kit N. di catalogo GD-404-1001	*Reibridazione primer per Rapid Run HiSeq (n. codice 15059379)*
TruSeq Rapid Rehyb Kit N. di catalogo GD-402-2001	*Reibridazione primer per Rapid Run (Corsa rapida) TruSeq (n. codice 15039627)*

Indice

G

H

I

L

M

N

P

R

S

T

U

V

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 16 Dati di contatto generali Illumina

Indirizzo	5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 U.S.A.
Sito Web	www.illumina.com
E-mail	techsupport@illumina.com

Tabella 17 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Norvegia	800.16836
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.0223859
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

Schede di sicurezza sui materiali (MSDS)

Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito web di Illumina. Andare al sito support.illumina.com e selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com